



## **FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y  
Microbiología**

**Programa de Doctorado en Epidemiología y Salud Pública**

---

Marcadores serológicos de riesgo de cáncer  
gástrico y colorrectal relacionados con la  
infección por *Helicobacter pylori*

---

## **TESIS DOCTORAL**

Nerea Fernández de Larrea Baz

Directora: Dra. Nuria Aragonés Sanz

Madrid, 2019

**A mi Familia**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis, la Dra. Nuria Aragonés, por animarme a emprender este proyecto y acompañarme durante todo el camino ofreciéndome generosamente sus conocimientos, tiempo, apoyo y cariño. Ha sido un privilegio trabajar contigo y contar con el ejemplo de tu profesionalidad.

A los compañeros y compañeras del Área de Epidemiología Ambiental y del Cáncer del Centro Nacional de Epidemiología, por su acogida, su compañerismo y su buen hacer profesional.

A todas las personas que han participado en el estudio MCC-Spain, por creer en la utilidad de la investigación y colaborar en este estudio de manera desinteresada. En especial a las personas enfermas de cáncer que aceptaron participar a pesar de estar atravesando momentos difíciles. Gracias también a todas las personas, de distintos ámbitos profesionales, que han trabajado para poner en marcha y llevar a cabo el estudio MCC-Spain, y a la sociedad en general, ya que este trabajo ha sido realizado con financiación pública.

A los coautores de los artículos incluidos en esta tesis por sus aportaciones en la revisión de los mismos. Gracias a Marina, Beatriz y Virginia por su dedicación, por las múltiples revisiones de los manuscritos y por sus acertadas propuestas de mejora. Gracias a Adela y a Roberto por su asesoramiento estadístico en la realización del análisis de componentes principales y en la preparación de la respuesta a los revisores del artículo sobre el cáncer gástrico. Thank you to Michael and Angelika for their comments to the manuscripts and their explanations about the multiplex serology technique.

Al personal del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad Autónoma de Madrid por su orientación en la realización de todos los trámites relacionados con el doctorado.

Gracias siempre a mi familia y a mis amigos por ser como son y por su apoyo incondicional.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>ALCANCE DE LA TESIS .....</b>	<b>2</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
1.1. Epidemiología del cáncer gástrico y del cáncer colorrectal .....	9
1.2. Papel causal de las infecciones en el desarrollo de cáncer .....	14
1.3. La infección por <i>Helicobacter pylori</i> .....	16
1.4. Relación entre la infección crónica por <i>H. pylori</i> y el cáncer gástrico .....	22
1.5. Relación entre la infección crónica por <i>H. pylori</i> y el cáncer colorrectal .....	27
1.6. Marcadores serológicos de riesgo de cáncer gástrico y colorrectal .....	28
<b>2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....</b>	<b>31</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4. METODOLOGÍA GENERAL Y PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS COMPENDIADOS .....</b>	<b>36</b>
-MCC-Spain .....	37
-Serología múltiple para <i>H. pylori</i> .....	38
-Estudio 1. Biomarcadores de riesgo de cáncer gástrico relacionados con la serología frente a <i>Helicobacter pylori</i> en el estudio de casos y controles MCC-Spain.....	40
-Estudio 2. Reactividad de anticuerpos frente a <i>Helicobacter pylori</i> y riesgo de cáncer colorrectal en un estudio de casos y controles en España .....	41
-Estudio 3. Reactividad de anticuerpos frente a proteínas de <i>Helicobacter pylori</i> en una muestra de población adulta en España en 2008-2013 .....	42
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
-Estudio 1.....	44
-Estudio 2.....	47
-Estudio 3.....	51
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
6.1. Aspectos metodológicos.....	54
6.2. Interpretación de los resultados .....	57
6.3. Implicaciones en salud pública .....	61
6.4. Contribución al estado del conocimiento e investigaciones futuras .....	62
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>66</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>75</b>
-Artículo 1 .....	76
-Artículo 2 .....	90
-Artículo 3 .....	109



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### Tablas

Tabla 1. Principales factores de riesgo conocidos de cáncer gástrico.

Tabla 2. Principales factores de riesgo conocidos de cáncer colorrectal esporádico.

Tabla 3. Riesgo de cáncer gástrico no-cardias entre los sujetos seropositivos frente a *H. pylori*, en función de la puntuación en cada uno de los dos patrones de reactividad de anticuerpos obtenidos en el análisis de componentes principales.

Tabla 4. Asociación entre el cáncer colorrectal y la seropositividad frente a *H. pylori*.

Tabla 5. Asociación entre el riesgo de cáncer colorrectal y la seropositividad frente a *H. pylori*, por grupos de edad y sexo.

### Figuras

Figura 1. Evolución en los países que aportan datos a la OMS de las tasas de mortalidad por cáncer gástrico estandarizadas por edad por la población estándar mundial y suavizadas.

Figura 2. Evolución en los países que aportan datos a la OMS de las tasas de mortalidad por cáncer colorrectal estandarizadas por edad por la población estándar mundial y suavizadas.

Figura 3. Proporción de casos nuevos de cáncer en 2012 atribuible a cada uno de los principales agentes infecciosos implicados en el desarrollo del cáncer.

Figura 4. Prevalencia de infección por *H. pylori* en los distintos países a nivel mundial, estimada a partir del metanálisis de estudios publicados en cada país.

Figura 5. Asociación entre el riesgo de cáncer gástrico (no-cardias y cardias) y la positividad de anticuerpos frente a cada una de las proteínas de *H. pylori* estudiadas, entre los sujetos seropositivos para *H. pylori*.

Figura 6. Pesos asignados a la reactividad de anticuerpos frente a las proteínas de *H. pylori* estudiadas, en cada uno de los componentes extraídos del análisis de componentes principales.

Figura 7. Asociación entre la seropositividad frente a cada proteína de *H. pylori* y el riesgo de cáncer colorrectal entre los participantes seropositivos a *H. pylori*.

Figura 8. Asociación entre la seropositividad frente a cada proteína de *H. pylori* estudiada y el riesgo de cáncer colorrectal, por grupos de edad y sexo.

Figura 9. Asociación entre la seropositividad frente a cada proteína de *H. pylori* y el riesgo de cáncer de colon derecho, colon izquierdo y recto entre los participantes seropositivos a *H. pylori*.

Figura 10. Porcentaje de seropositividad frente a cada proteína en personas *H. pylori* positivas, por grupo de edad y sexo.

Figura 11. Gráficos edad-cohorte de la seropositividad frente a cada proteína de *H. pylori* en sujetos *H. pylori* positivos.

## **ALCANCE DE LA TESIS**

Esta tesis se presenta como un compendio de 3 artículos, realizados en el marco del proyecto de investigación “Etiopatogenia del cáncer gástrico en España: Posible interacción microbiano-ambiental en un estudio multicéntrico de casos y controles de base poblacional (MCC-Spain *Gastric Cancer*)”, con número de expediente PI11/01403, financiado por el Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de la Unión Europea – una manera de hacer Europa-.

El mencionado proyecto de investigación se encuadra a su vez dentro del estudio MCC-Spain, financiado por el Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP) y por la Acción Transversal del Cáncer, aprobada por el Consejo de Ministros del 11 de octubre de 2007 y financiada por el Gobierno y las Comunidades Autónomas.

## RESUMEN

Desde que surgieron las primeras hipótesis acerca de un posible papel de algunos agentes infecciosos en la etiología del cáncer a finales del siglo XIX, se ha venido avanzando en el conocimiento tanto de los agentes implicados como de los mecanismos por los cuales se produce esta asociación. En la actualidad, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) ha clasificado como carcinógenos probados para humanos 11 agentes infecciosos, entre los que la única bacteria es *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). La infección crónica por *H. pylori* se ha asociado con un riesgo aumentado de adenocarcinoma gástrico y de linfoma gástrico de células B tipo MALT, además de con otras patologías digestivas como la úlcera péptica y la gastritis crónica atrófica. En la última monografía publicada en 2012 por la IARC sobre el papel carcinogénico de los agentes biológicos no se concluye que exista una asociación de la infección por *H. pylori* con el cáncer colorrectal. Algunos metanálisis publicados posteriormente sugieren que podría estar asociada con un incremento de riesgo de este tumor, pero el nivel de evidencia es todavía insuficiente.

A pesar de que la asociación de la infección crónica por *H. pylori* con el cáncer gástrico, más específicamente con el cáncer gástrico no-cardias, está bien establecida, no se conocen en profundidad los factores que hacen que en unas personas se desarrolle un cáncer y en otras, una mayoría, no lo haga. Se considera que la diferente evolución depende de factores relacionados con la persona, con la bacteria, con factores ambientales y con la interacción entre ellos. Esta tesis trata de profundizar en algunos factores bacterianos, analizados a través de la respuesta de anticuerpos en las personas infectadas, que podrían modular el riesgo de cáncer gástrico y en la posible relación de dichos factores con el riesgo de cáncer colorrectal.

Los objetivos que se plantean son: 1) Estimar el riesgo de cáncer gástrico de cardias y no-cardias asociado a la respuesta de anticuerpos frente a 16 proteínas de *H. pylori*; 2) Identificar patrones de respuesta serológica frente a estas proteínas que permitan definir subgrupos de población que presenten un riesgo especialmente alto o bajo de cáncer gástrico; 3) Evaluar si existe una asociación entre la respuesta de anticuerpos frente a 16 proteínas de *H. pylori* y el riesgo de cáncer colorrectal; 4) Evaluar la existencia de diferencias en esta posible asociación en función de la localización del tumor (colon derecho, colon izquierdo o recto); y 5) Estimar la seroprevalencia de infección por *H. pylori* y la seropositividad frente a 16 proteínas de la bacteria en una muestra de la población española y su variabilidad en función de la edad, el sexo y el lugar de nacimiento.

Para alcanzar estos objetivos se han analizado los datos provenientes del estudio MCC-Spain, un estudio multicaso-control llevado a cabo en 12 provincias españolas con el objetivo de identificar factores de riesgo ambientales y genéticos de cinco tipos de tumores (cáncer de mama, próstata, colorrectal, gástrico y leucemia linfática crónica). El protocolo del estudio fue aprobado por los Comités de Ética de la Investigación de las instituciones participantes, y todas las personas que aceptaron participar en el mismo firmaron un consentimiento informado. Los criterios de inclusión de los participantes fueron tener una edad entre 20 y 85 años, haber residido en el área de reclutamiento durante al menos los 6 meses previos al diagnóstico (para los casos) o al reclutamiento (para los controles) y tener capacidad para responder al cuestionario epidemiológico. Se incluyeron un total de 459 casos incidentes de cáncer gástrico y 2.140 de cáncer colorrectal y 4.098 controles poblacionales. De estos, se obtuvo información del estado serológico frente a *H. pylori* en 281, 1.488 y 2.555, respectivamente. La información epidemiológica se recogió mediante entrevista personal y la información clínica relacionada con el tumor mediante revisión de historias clínicas o consulta con los registros de tumores. La respuesta de anticuerpos frente a 16 proteínas de *H. pylori* se analizó mediante la técnica de serología múltiple para *H. pylori*. Se consideraron seropositivos frente a *H. pylori* los participantes que presentaban una respuesta de anticuerpos positiva frente a cuatro o más proteínas.

Este trabajo se ha estructurado en tres estudios, cada uno de los cuales se centra en dar respuesta a unos objetivos. Los resultados principales de cada uno de ellos se resumen a continuación.

En el estudio 1, que aborda los objetivos 1 y 2, la seropositividad frente a *H. pylori* se asoció con el riesgo de cáncer gástrico no-cardias con una OR=1,90 (IC 95%: 1,01–3,56). De las 16 proteínas analizadas, se encontró una asociación positiva independiente entre la seropositividad frente a la proteína bacteriana CagA (OR=3,65 [IC 95%: 2,44–5,46]) y el riesgo de cáncer gástrico no-cardias, y una asociación inversa con la seropositividad frente a la proteína Cagδ (OR=0,66 [IC 95%: 0,47–0,92]). No se encontró asociación con un riesgo mayor de cáncer gástrico de cardias. Se identificaron dos patrones de respuesta de anticuerpos frente a las proteínas de *H. pylori* analizadas: uno caracterizado por reactividad de anticuerpos alta frente a GroEL, NapA, UreA, HyuA, Catalasa y HP231, el cual se asoció con menos riesgo de cáncer gástrico no-cardias (OR<sub>cuartil 4 frente a cuartil 1</sub>=0,40 [IC 95%: 0,25–0,63]), y otro caracterizado por alta reactividad de anticuerpos frente a CagA y VacA, el cual se asoció con un riesgo mayor de dicho tumor (OR<sub>cuartil 4 frente a cuartil 1</sub>=3,03 [IC 95%: 1,83–5,02]).

En el estudio 2, que aborda los objetivos relacionados con el cáncer colorrectal (objetivos 3 y 4), no se encontró un riesgo mayor de este tumor asociado a la seropositividad frente a *H. pylori*

(OR=0,91 [IC95%: 0,71-1,16]). La única proteína cuya seropositividad se asoció de forma independiente con el riesgo de cáncer colorrectal fue Cag $\delta$ , que mostró una asociación inversa (OR=0,81 [IC95%: 0,70-0,94]). No se observó heterogeneidad estadísticamente significativa en los resultados entre los tumores de colon derecho, colon izquierdo y recto, excepto en la asociación con la respuesta serológica frente a Cag $\delta$ , que se asoció de forma estadísticamente significativa con el cáncer de colon (derecho e izquierdo), pero no con el de recto. Se identificó una posible modificación del efecto en función de la edad y el sexo. En mujeres mayores de 64 años la seropositividad frente a *H. pylori* se asoció con un riesgo mayor de cáncer colorrectal, mientras que en hombres del mismo grupo de edad y en mujeres más jóvenes no se observó asociación y en hombres menores de 65 años se asoció con un riesgo menor (valor p de la interacción: 0,005).

En el estudio 3, que analiza, en las personas del grupo control del estudio MCC-Spain, la respuesta de anticuerpos frente a 16 proteínas de *H. pylori* en función de la edad, el sexo y el lugar de nacimiento (objetivo 5), se observó en ambos sexos una seroprevalencia global de *H. pylori* mayor en los grupos de edad más avanzada. En todos los grupos de edad estudiados la seroprevalencia fue menor en mujeres que en hombres. La diferencia entre regiones de nacimiento en el porcentaje de seroprevalencia y en el de seropositividad frente a las distintas proteínas, por grupos de edad y sexo, fue en promedio del 20%. Entre las personas *H. pylori* positivas, las proteínas con el mayor porcentaje de seropositividad fueron GroEL (81%), NapA (74%), HP231 (72%) y Omp (66%). La seropositividad frente a la mayoría de las proteínas aumentaba o se mantenía estable con la edad; las excepciones fueron HP231, HP305, Omp y HcpC, cuyo porcentaje de seropositividad era menor en los grupos de edad más avanzada (en el caso de HcpC solo en mujeres).

En conclusión, la seropositividad frente a *H. pylori* en la población estudiada se asoció con un aumento del 90% en el riesgo de cáncer gástrico no-cardias y no se asoció con un riesgo mayor de cáncer de cardias. En personas seropositivas frente a *H. pylori*, un patrón de respuesta de anticuerpos con niveles altos de reactividad frente a las proteínas CagA y VacA se asoció con un incremento del riesgo de cáncer gástrico no-cardias de hasta 3 veces (cuartil superior con respecto al cuartil inferior), mientras que un patrón de respuesta de anticuerpos con niveles altos de reactividad frente a varias proteínas de esta bacteria, especialmente UreA, HP231, NapA, HyuA y Catalasa, se asoció con una reducción del riesgo de cáncer gástrico no-cardias de hasta un 60% (cuartil superior con respecto al cuartil inferior). Ni la seropositividad global frente a *H. pylori* ni la seropositividad frente a CagA se asociaron con un riesgo mayor de cáncer de colon o de recto. Podría existir un efecto diferente de la infección por *H. pylori* en el riesgo de cáncer colorrectal en función de la edad y el sexo, aunque este hallazgo requeriría confirmación adicional en otros estudios. La seropositividad frente a la proteína Cag $\delta$  de *H. pylori* podría ser un marcador de menor riesgo tanto de cáncer gástrico como colorrectal. En la población estudiada existe variabilidad en el

perfil de anticuerpos frente a *H. pylori* en función de la edad, el sexo y la región de nacimiento. Por último, la escasa diferencia observada en el porcentaje de seropositividad frente a *H. pylori* entre edades más jóvenes y las más avanzadas pone de manifiesto la importancia que todavía tiene hoy en día esta infección en la población estudiada y la necesidad de mantener la vigilancia de las enfermedades relacionadas con la infección, así como la investigación sobre sus factores de riesgo y medidas preventivas.

**ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS**

AVAD	Años de vida perdidos ajustados por discapacidad
EEUU	Estados Unidos
GST	Glutation S-Transferasa
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HTLV-1	Virus linfótrofo T humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agencia Internacional de Investigación en Cáncer)
IC 95%	Intervalo de confianza al 95%
IMC	Índice de masas corporal
MALT	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i> (Tejido linfoide asociado a mucosas)
MFI	<i>Median reporter Fluorescence Intensity</i> (Mediana de la intensidad de la fluorescencia)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Razón de odds ( <i>odds ratio</i> )
REDECAN	Red Española de Registros de Cáncer
VEB	Virus de Epstein-Barr
VHH-8	Virus herpes humano tipo 8
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano

## 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1. Introducción

### 1.1. Epidemiología del cáncer gástrico y del cáncer colorrectal

#### 1.1.1. Cáncer gástrico

El cáncer gástrico representa la tercera **causa de muerte** por cáncer en el mundo, por detrás del cáncer de pulmón y el de hígado (1). En Europa y en España este tumor se sitúa en sexto lugar en cuanto a número de defunciones. La evolución de las tasas de mortalidad por cáncer gástrico muestran un marcado descenso desde la segunda mitad del siglo XX en ambos sexos, tanto a nivel mundial como en Europa y en España (2,3). Según los últimos datos disponibles, correspondientes al año 2015, en España se produjeron 2.175 defunciones por este tumor en mujeres y 3.326 en hombres, cifras que se corresponden con tasas estandarizadas por la población estándar europea de 4,7 defunciones por cada 100.000 mujeres y 9,9 por cada 100.000 hombres (4).

En cuanto a la **incidencia**, se estima que en 2012 se diagnosticaron 951.594 casos de cáncer gástrico en todo el mundo, 139.667 en Europa y 7.810 en España, representando el quinto tumor con mayor incidencia a nivel mundial (5) y el sexto a nivel europeo y estatal (5–7). Mediante cálculos basados en la razón incidencia/mortalidad, la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) ha estimado la incidencia del cáncer de estómago en la población española en 2015 en 8.456 casos, con tasas ajustadas por la población estándar europea de 8,0 y 16,2 por 100.000 habitantes en mujeres y hombres, respectivamente (8).

En relación con la **situación en otros países de Europa**, las tasas de incidencia y de mortalidad de España, estandarizadas por edad, son similares a la media de los 27 estados miembros de la Unión Europea, tanto en hombres como en mujeres (6).

En la Figura 1 se observa la **evolución** decreciente de las tasas de mortalidad por cáncer gástrico en los últimos 30 años en España y en los distintos países que aportan datos a la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las tasas de incidencia también han ido disminuyendo en los últimos años, habiéndose estimado para España entre 1980 y 2003, un descenso anual del 1,9% en hombres y del 2,6% en mujeres (9). Aunque la información disponible desagregada por tipo de tumor en función de la localización es limitada, la disminución observada en la incidencia y mortalidad parece ser a expensas principalmente del cáncer gástrico no-cardias o distal, mientras que el cáncer de cardias parece tener unas tasas mantenidas o incluso un cierto incremento en los últimos años (10). Aun así, la incidencia de cáncer gástrico no-cardias es mayor que la de cardias en la mayoría de los países, incluido España, con una razón, en promedio, de 2:1 (9,11).

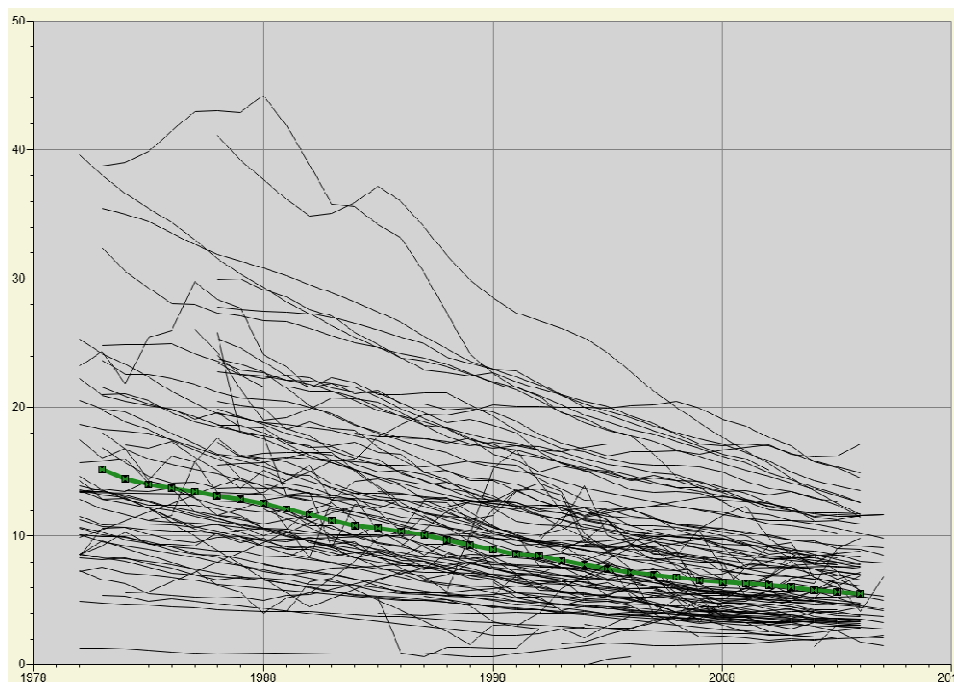


Figura 1. Evolución en los países que aportan datos a la OMS de las tasas de mortalidad por cáncer gástrico estandarizadas por edad por la población estándar mundial y suavizadas (tasas por 100.000 habitantes). Cada línea corresponde a los datos de un país de entre los que proporcionan sus datos de mortalidad a la OMS. La línea resaltada con puntos corresponde a los datos de España.

Fuente: base de datos de mortalidad de la OMS

(<http://apps.who.int/healthinfo/statistics/mortality/whodpms/>)

En términos de **carga de enfermedad** medida como años de vida perdidos ajustados por discapacidad (AVAD), el cáncer de estómago es el tercero que mayor número de AVAD ocasionó en 2015 a nivel mundial, por detrás del cáncer de pulmón y el de hígado (7).

La **distribución geográfica** del cáncer gástrico muestra diferencias importantes entre regiones, con tasas estandarizadas de mortalidad en general más elevadas en países menos desarrollados, donde tienen lugar el 76% de las defunciones por esta enfermedad. Las tasas más altas se registran en algunos países de Asia y de América Latina, y las más bajas en algunos países de Europa, África y América del Norte (5). Las tasas de mortalidad varían incluso dentro de un mismo país, como es el caso de España, donde se ha observado un patrón geográfico mantenido a lo largo del tiempo (12), con tasas de mortalidad especialmente elevadas en Castilla y León y en Galicia (13,14).

La **supervivencia** del cáncer gástrico es baja, situándose la supervivencia relativa a los 5 años, en el caso de España, en un 27% (15), a pesar de la ligera mejoría estimada para los pacientes diagnosticados en el año 2004 con respecto a los diagnosticados en 1992. Esta mejoría, de un 6%, fue similar a la de otros países de nuestro entorno (6% en Suiza, 4% en Italia y 2% en Francia)

(16). Estas bajas tasas de supervivencia se explican en gran medida porque con frecuencia el diagnóstico se realiza en estadios avanzados, debido a la ausencia de síntomas específicos de la enfermedad en sus etapas iniciales. Este hecho hace que la prevención primaria sea especialmente importante en este tipo de tumores.

Los **factores de riesgo** más establecidos para el cáncer gástrico son los que se muestran en la Tabla 1 (10,17–20). La edad y los factores genéticos son factores de riesgo comunes a la mayoría de los cánceres. Aproximadamente un 10% de los casos de cáncer gástrico presentan una agregación familiar, y un 1-3% se dan en el contexto de síndromes hereditarios como el cáncer gástrico hereditario difuso, síndrome causado en alrededor de un 40% de los casos por una mutación de alta penetrancia en la línea germinal en un gen que codifica para la E-caderina (gen *CDH1*), el síndrome de adenocarcinoma gástrico y poliposis gástrica proximal, así como determinados síndromes de cáncer colorrectal familiar como el síndrome de Lynch, el de Li-Fraumeni, el de Peutz-Jeghers o la Polipomatosis Adenomatosa Familiar (21,22). Además, el sexo masculino se asocia con un riesgo mayor de cáncer gástrico. Este tumor es dos veces más frecuente en hombres que en mujeres. Aunque no se conocen con certeza las causas de esta diferente incidencia en función del sexo, se considera que a ella podrían estar contribuyendo factores hormonales y/o diferencias en los estilos de vida o en la exposición a factores ambientales, entre otros.

Tabla 1. Principales factores de riesgo conocidos de cáncer gástrico

Edad
Sexo masculino
Tabaco
Consumo elevado de alcohol
Ingesta elevada de alimentos en salazón
Exposición ocupacional al asbesto
Exposición a radiaciones ionizantes
Antecedentes familiares de primer grado de cáncer de estómago
Obesidad (cardias)
Enfermedad por reflujo gastroesofágico (cardias)
Infección crónica por <i>H. pylori</i> (no-cardias)
Ingesta elevada de carnes procesadas (no-cardias)

Entre los factores relacionados con los estilos de vida que se han asociado con el riesgo de desarrollar cáncer gástrico se encuentran el consumo de tabaco y alcohol, así como algunos factores de la dieta. Una ingesta elevada de alimentos conservados en salazón se ha relacionado con un aumento de riesgo de cáncer gástrico en general, y una dieta rica en carnes procesadas se ha relacionado con un riesgo mayor de cáncer gástrico no-cardias. Otros componentes de la dieta han sido sugeridos como posibles factores de riesgo o protectores frente al cáncer gástrico, aunque el nivel de evidencia que sustenta estas asociaciones es menor. La obesidad se ha asociado

principalmente con un aumento de riesgo de cáncer gástrico localizado en la zona del cardias. Por su parte, el principal factor de riesgo establecido para el cáncer gástrico no-cardias es la infección crónica por *H. pylori*, habiéndose estimado su fracción atribuible en un 89% (21).

Algunas exposiciones ocupacionales como la exposición al asbesto o a radiaciones ionizantes se han relacionado con el riesgo de cáncer gástrico. Este es también el caso de algunas patologías como la enfermedad por reflujo gastroesofágico, que se ha asociado con un riesgo mayor de cáncer gástrico, específicamente el localizado en el cardias.

Por su parte, las diferencias geográficas observadas en la mortalidad por cáncer de estómago sugieren la posible existencia de factores ambientales involucrados en su etiología. Entre otros, se han propuesto la exposición al arsénico o al cromo a través del agua de bebida o de la dieta (12,14).

### 1.1.2. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal representa la cuarta causa de **mortalidad** por cáncer en el mundo (1). En Europa y en España estos tumores se sitúan en segundo lugar en cuanto al número de defunciones (3,5). A diferencia de lo observado en el cáncer gástrico, la mortalidad por cáncer colorrectal en España muestra una tendencia creciente hasta finales de la década de los noventa y una estabilización posterior, con un ligero incremento en hombres y un ligero descenso en mujeres en los últimos años (3). Según los últimos datos disponibles, correspondientes al año 2015, en España se produjeron 6.279 defunciones por cáncer colorrectal en mujeres (tasa estandarizada por la población estándar europea de 9,9 por 100.000 para cáncer de colon y de 3,0 para cáncer de recto) y 9.084 en hombres (tasa estandarizada por la población estándar europea de 19,1 por 100.000 para cáncer de colon y de 7,2 para cáncer de recto) (4).

En cuanto a la **incidencia**, se estima que en 2012 se diagnosticaron 1.360.602 casos de cáncer colorrectal en todo el mundo, 447.136 en Europa y 32.240 en España, representando el tercer tumor con mayor número de casos nuevos a nivel mundial, el segundo en Europa y el primero en España (5). Mediante cálculos basados en la razón incidencia/mortalidad, la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) ha estimado la incidencia de los tumores colorrectales en la población española en 2015 en 41.441 casos (tasas ajustadas por la población estándar europea, 42,0 y 77,8 por 100.000 habitantes en mujeres y hombres, respectivamente) (8).

Con respecto a la situación en **otros países de Europa**, las tasas incidencia y de mortalidad en España, estandarizadas por edad, son similares a la media de los 27 estados miembros de la Unión Europea, tanto en hombres como en mujeres (6).

En la Figura 2 se observa la **evolución** de las tasas de mortalidad por cáncer colorrectal desde el año 1980 en España y en los demás países que aportan datos de mortalidad a la OMS.

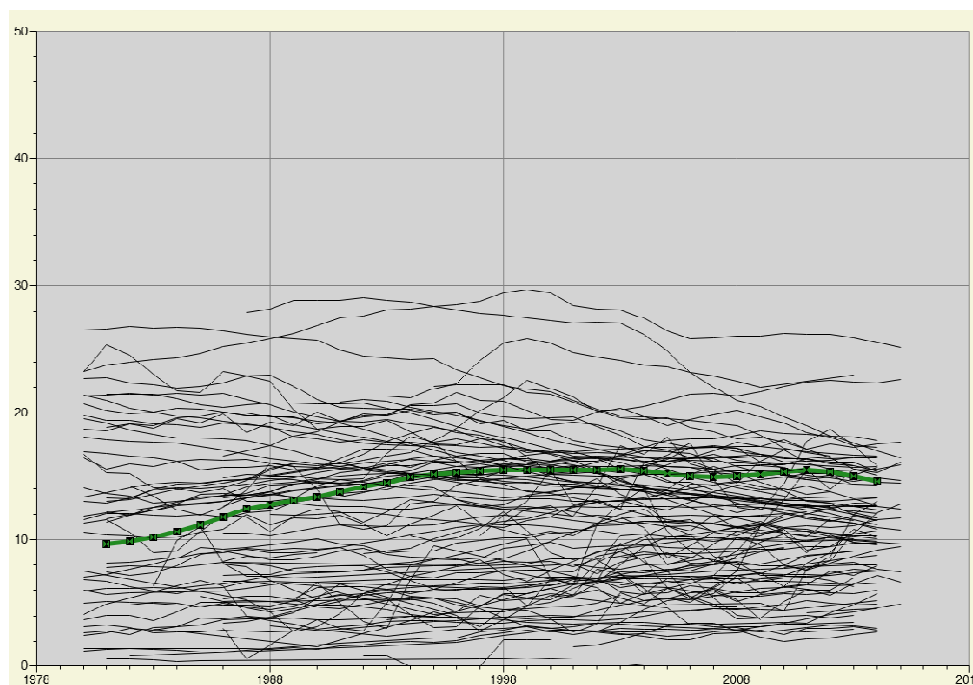


Figura 2. Evolución en los países que aportan datos a la OMS de las tasas de mortalidad por cáncer colorrectal estandarizadas por edad por la población estándar mundial y suavizadas (tasas por 100.000 habitantes). Cada línea corresponde a los datos de un país de entre los que proporcionan sus datos de mortalidad a la OMS. La línea resaltada con puntos corresponde a los datos de España.

Fuente: base de datos de mortalidad de la OMS

(<http://apps.who.int/healthinfo/statistics/mortality/whodpms/>)

En términos de **carga de enfermedad**, medida como años de vida perdidos ajustados por discapacidad (AVAD), el cáncer colorrectal fue el cuarto que mayor número de AVAD ocasionó en 2015 a nivel mundial, por detrás de los cánceres de pulmón, hígado y estómago (7).

La **distribución geográfica** del cáncer colorrectal no es homogénea, encontrándose tasas estandarizadas de mortalidad en general más elevadas en países más desarrollados, donde tienen lugar el 52% de las defunciones por esta enfermedad. Las tasas más altas se registran en algunos países de Europa, Australia y América del Norte y las más bajas en algunos países de África y de Asia continental (5). En España, la variabilidad en las tasas de mortalidad entre provincias es relativamente baja (3).

La **supervivencia** relativa a los cinco años del cáncer colorrectal se encuentra ligeramente por encima de la media de todos los tumores, situándose en España alrededor del 58%, según los datos

más recientes (15). Se ha estimado que la supervivencia neta a los 5 años ha aumentado un 11% entre las personas diagnosticadas en el año 1992 y las diagnosticadas en 2004 para el cáncer de colon (23) y un 18% para el de recto (24). Es posible que esta cifra sea superior para las personas diagnosticadas en la actualidad, gracias a los programas poblacionales de detección precoz de la enfermedad y a las mejoras en los tratamientos.

Aproximadamente un 5% de los casos de cáncer colorrectal se dan en el contexto de síndromes hereditarios como el Síndrome de Lynch y la Poliposis Adenomatosa Familiar, los cuales se asocian con un riesgo muy elevado de desarrollar este cáncer. Con respecto al cáncer colorrectal esporádico, los **factores de riesgo** más aceptados en la literatura científica son la historia familiar de cáncer colorrectal, la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), el sedentarismo, el consumo de tabaco, el consumo excesivo de alcohol, la ingesta elevada de carnes rojas y procesadas, la ingesta baja de fibra, la obesidad y la diabetes mellitus (Tabla 2) (25). Otros factores que se han relacionado con el riesgo de cáncer colorrectal pero cuya asociación está menos establecida son determinadas infecciones, entre ellas la infección por *H. pylori*, y una ingesta baja de frutas y verduras, de pescado y de productos lácteos.

El cáncer colorrectal, al igual que el cáncer gástrico, es más frecuente en hombres que en mujeres, lo cual podría implicar la influencia de factores hormonales en el desarrollo de estos tumores, así como posibles diferencias entre hombres y mujeres en los estilos de vida relacionados con el riesgo de cáncer colorrectal.

Tabla 2. Principales factores de riesgo conocidos de cáncer colorrectal esporádico
Edad
Sexo masculino
Enfermedad inflamatoria intestinal
Consumo elevado de alcohol
Ingesta elevada de carnes rojas y procesadas
Ingesta baja de fibra
Antecedentes familiares de primer grado de cáncer colorrectal
Obesidad
Diabetes mellitus
Sedentarismo
Tabaco

## 1.2. Papel causal de las infecciones en el desarrollo de cáncer

Las primeras hipótesis sobre el posible papel de agentes infecciosos en la etiología del cáncer surgieron a finales del siglo XIX, cuando se comenzó a sospechar una asociación entre la

infestación por algunos parásitos (duelas hepáticas y *Schistosoma*) y el cáncer de hígado y de vejiga. Sin embargo fue durante la segunda mitad del siglo XX cuando surgieron nuevas hipótesis, relacionadas principalmente con infecciones víricas, y se desarrolló la investigación que conduciría al establecimiento del papel causal de los agentes infecciosos en el cáncer. En la actualidad, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (la IARC, por sus siglas en inglés) clasifica como **carcinógenos probados para humanos** 11 agentes infecciosos:

- Siete virus: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus linfótrofo T humano (HTLV-1), virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi (VHH-8), 7 serotipos del virus del papiloma humano (VPH), virus de Epstein-Barr (VEB), virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C.
- Tres parásitos: *Schistosoma haematobium*, *Clonorchis sinensis* y *Opisthorchis viverrini*.
- Una bacteria: *Helicobacter pylori*.

Para el total de casos de cáncer incidentes en 2012 a nivel mundial, se ha estimado que la **fracción atribuible** a las infecciones fue del 15,4%, siendo este porcentaje mayor en las regiones menos desarrolladas que en las más desarrolladas (23,4% y 9,2%, respectivamente). En Europa la fracción atribuible se ha estimado en un 7,2%, mientras que en algunos países de África esta cifra supera el 50%. Como se puede observar en la Figura 3, los agentes infecciosos que mayor número de casos producen son, por orden decreciente, *H. pylori* (35% del total), el VPH (30%) y el virus de la Hepatitis B (19%). Según estas estimaciones, los tumores de los que mayor número de casos se evitarían si no existieran estas infecciones son los de estómago, hígado y cérvix (26).

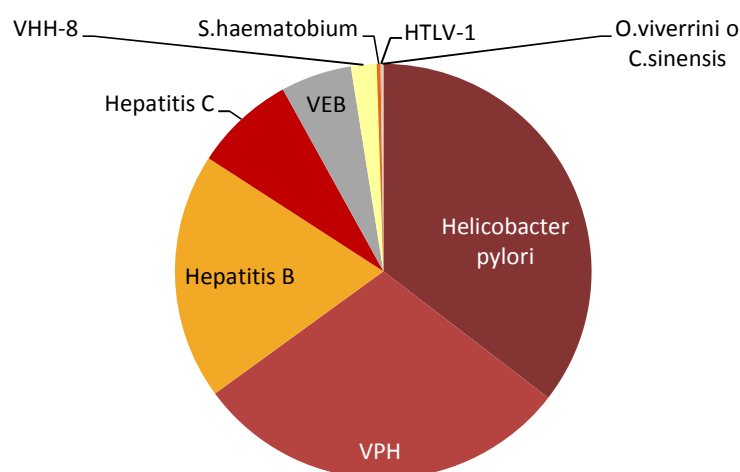


Figura 3. Proporción de casos nuevos de cáncer en 2012 atribuible a cada uno de los principales agentes infecciosos implicados en el desarrollo de cáncer.

En los últimos años la investigación de la relación entre las infecciones y el cáncer ha experimentado un amplio desarrollo gracias a los avances técnicos y metodológicos en los ámbitos de la investigación experimental, clínica y epidemiológica. Aunque aún falta mucho por conocer, este desarrollo está dando lugar a progresos notables en el conocimiento de los mecanismos patogénicos subyacentes, así como en el descubrimiento de los microorganismos implicados en el desarrollo de diferentes tumores. Actualmente se considera que existen principalmente tres **mecanismos de carcinogénesis** relacionados con las infecciones:

- Un mecanismo directo, en el que los propios microorganismos o sustancias liberadas por ellos ejercen un efecto carcinógeno.
- Un mecanismo mediado por la inflamación crónica secundaria a la infección.
- Un mecanismo mediado por la inmunosupresión asociada a determinadas infecciones (27).

A pesar de la reconocida implicación de estos microorganismos en la etiología de determinados cánceres, la mayoría de las personas infectadas por ellos no desarrolla ninguno de dichos tumores. Por ello se considera que existen factores adicionales, tanto de la persona como del propio microorganismo y del ambiente, que modulan de forma importante el proceso de carcinogénesis.

### **1.3. La infección por *Helicobacter pylori***

#### **1.3.1. Características microbiológicas**

*H. pylori* es un bacilo gram negativo, microaerófilo, flagelado, capaz de sobrevivir en el medio ácido del estómago humano, el cual representa el principal reservorio de la infección. Los primeros datos de la existencia de esta bacteria hacen referencia a la descripción, a principios del siglo XX, de la presencia en la mucosa gástrica de un microorganismo en forma de espiral. Sin embargo, no fue hasta 1982 cuando Marshall y Warren consiguieron aislar la bacteria (28). En un primer momento se denominó *Campylobacter pylori*, hasta que en 1989 se propuso un género nuevo, *Helicobacter*, y pasó a denominarse *Helicobacter pylori*. Este género actualmente pertenece a la familia *Helicobacteraceae*, que junto con la familia *Campylobacteraceae* forman parte del orden *Campylobacterales*, dentro de la clase *Epsilonproteobacteria*.

En cuanto a su morfología y estructura, *H. pylori* mide entre 2,5 y 4 µm de longitud y entre 0,5 y 1 µm de anchura. Tiene forma espiral o ligeramente curvada, y posee de 2 a 6 flagelos unipolares de unas 2,5 µm de longitud que le confieren movilidad incluso en medios viscosos. En determinadas condiciones puede adquirir forma coccoide, la cual en algunos estudios ha demostrado ser viable.



La pared celular puede estar recubierta de un glicocálix de hasta 40 nm de espesor. Esta bacteria es oxidasa positiva, catalasa positiva y ureasa positiva. Se caracteriza, además, por una alta diversidad genómica, la cual se considera que puede contribuir a su adaptación al huésped humano (29). Tiene un cromosoma circular de aproximadamente 1.660.000 pares de bases. Se ha estimado que el genoma central de *H. pylori* contiene 1.111 genes y aproximadamente un 27% de variabilidad entre las distintas cepas (27,30).

### 1.3.2. Epidemiología de la infección

Estudios de paleobiología han sugerido la coexistencia de *H. pylori* con el ser humano desde hace más de 50.000 años (31). Esta larga trayectoria de convivencia ha dado lugar a un alto grado de adaptación de la bacteria al huésped humano.

Sin embargo, la **prevalencia** de la infección por *H. pylori* ha experimentado un marcado descenso a lo largo del siglo XX, principalmente en los países más desarrollados (32,33). Este descenso se ha atribuido a la mejora de las condiciones de saneamiento y de conservación de los alimentos, y al aumento del uso de antibióticos. Aun así, se estima que a nivel mundial más del 50% de la población está infectada por esta bacteria, aunque distintos estudios sugieren la existencia de una amplia variabilidad geográfica, siendo en general más alta la prevalencia de infección en países industrialmente menos desarrollados (32,33). En la Figura 4 se representa la prevalencia de infección estimada para los países sobre los que, en una revisión sistemática publicada recientemente, encontraron estudios con datos correspondientes a población general (33).

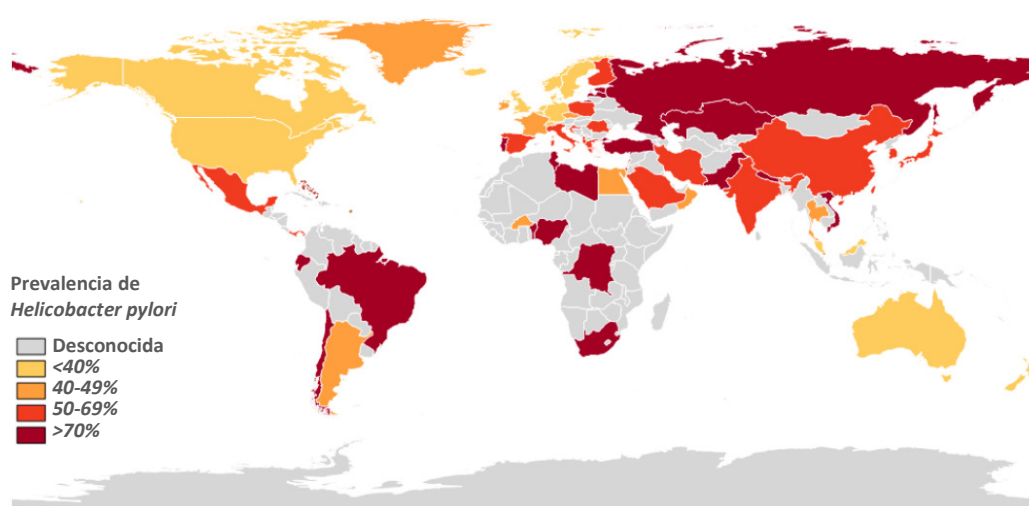


Figura 4. Prevalencia de infección por *H. pylori* en los distintos países a nivel mundial, estimada a partir del metanálisis de estudios publicados en cada país.

Fuente: Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, *et al.* Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta-analysis.

Gastroenterology. 2017;153(2):420–9. © 2017 by the AGA Institute. Published by Elsevier Inc.  
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>

En España no se conoce en profundidad la epidemiología de la infección. La información disponible proviene principalmente de estudios realizados a nivel local, los cuales han encontrado cifras de prevalencia en torno al 50-70% (34–43).

El principal **reservorio** de la infección es el ser humano, aunque algunos estudios apoyan la existencia también de reservorios ambientales, principalmente relacionados con el agua. Los **mecanismos de transmisión** de la infección no son del todo conocidos, pero se cree que la transmisión tiene lugar predominantemente de persona a persona por vía oral-oral, fecal-oral o gastro-oral, y en menor medida a través de los alimentos y del agua (44,45).

Los **factores de riesgo** que se han asociado de forma más consistente con una mayor prevalencia de infección son la edad y el nivel socioeconómico, observándose cifras más altas de prevalencia en población de mayor edad y de menor nivel socioeconómico (46,47). La mayor prevalencia en grupos de edad mayores se ha atribuido en parte a un efecto cohorte (47). En algunos estudios se ha observado también una mayor prevalencia asociada al género masculino, a personas de raza negra o de origen hispanico (en estudios realizados en EEUU), a tener un número mayor de hermanos, a una densidad mayor de personas en la vivienda habitual, a la convivencia con otras personas infectadas, a vivir en el medio rural, a ocupaciones laborales que conllevan contacto con tierra, a condiciones higiénicas deficientes, al consumo de tabaco, a la ingesta de determinados alimentos o a beber agua de pozo (47–53). Por el contrario, un consumo moderado de alcohol (54), la ingesta de determinados alimentos (55–59) y la lactancia materna (60) se han asociado en algunos estudios con un riesgo menor de infección por *H. pylori*.

Además, estudios realizados en gemelos monocigóticos y dicigóticos han sugerido la existencia de un componente genético en la susceptibilidad a la infección (61). Distintos estudios de asociación genética han identificado polimorfismos en diversos genes, principalmente relacionados con la respuesta inflamatoria, como posibles marcadores genéticos de susceptibilidad a la infección (62–66).

### 1.3.3. Historia natural de la infección

El estómago humano es un ambiente hostil para la mayoría de los microorganismos debido al pH ácido presente en su luz, a la capa de moco que recubre su epitelio y a los movimientos peristálticos que dificultan el contacto con y la adhesión a las células epiteliales de su mucosa. *H. pylori* se ha adaptado a estas condiciones y ha desarrollado estrategias que favorecen su

supervivencia en el estómago (67). Entre ellas, cabe destacar por un lado la producción de ureasa, que capta y transforma la urea en amonio, con el consiguiente incremento del pH, mecanismo que le permite sobrevivir en el medio ácido del estómago; por otro lado la presencia de uno o varios flagelos, que le permiten atravesar la barrera de moco que cubre la superficie mucosa y alcanzar la capa basal del epitelio gástrico y, finalmente, diversas proteínas de membrana que contribuyen a su adhesión a las células de la mucosa gástrica. *H. pylori* permanece preferentemente en el medio extracelular, en la capa de moco que recubre la pared gástrica, aunque también se encuentra adherida a las células epiteliales. Ejerce su efecto patogénico mediante la estimulación de la respuesta inmune e inflamatoria y mediante la secreción de citotoxinas que dañan directamente las células epiteliales (68).

La infección por *H. pylori* se adquiere generalmente en edades tempranas de la vida, principalmente en el ámbito familiar, aunque puede tener lugar a cualquier edad. En ausencia de tratamiento para su erradicación, en la mayoría de las personas la bacteria permanece como colonizadora de la mucosa gástrica durante toda la vida. Además, se pueden dar sobreinfecciones o reinfecciones como consecuencia de exposiciones repetidas al microorganismo. Inicialmente la infección se localiza predominantemente en el antro gástrico. La presencia de la bacteria y la gastritis asociada modifican la homeostasis de la secreción ácida del estómago. En aproximadamente un 12% de las personas infectadas, la infección se mantiene localizada en el antro gástrico y asociada a hiperclorhidria, lo cual aumenta el riesgo de desarrollar úlcera duodenal. En cambio, en otros casos la gastritis se extiende al cuerpo gástrico y se asocia a hipoclorhidria y a un aumento de riesgo de desarrollar úlcera gástrica o adenocarcinoma (69,70).

La infección por *H. pylori* induce una respuesta inmune e inflamatoria por parte del huésped, que activa la inmunidad celular y la humoral. En esta respuesta participan tanto la inmunidad innata como la adquirida. La primera está mediada principalmente por la acción de los macrófagos y las células dendríticas. La segunda es una respuesta principalmente mediada por los linfocitos T helper tipo 1, con la participación también de los T helper tipo 17 (70,71).

Esta respuesta por parte del huésped generalmente no consigue eliminar la infección y se genera una gastritis crónica superficial, que en la mayor parte de las personas es asintomática y no evoluciona a otras patologías. Sin embargo, aproximadamente en un 10-20% de las personas infectadas la infección crónica da lugar a una úlcera gástrica o duodenal, en un 1-2% a un adenocarcinoma gástrico y en un porcentaje menor, alrededor del 0,1%, a un linfoma gástrico tipo tejido linfático asociado a mucosas (MALT) (70).

En el caso del adenocarcinoma gástrico, una parte de ellos se desarrolla tras la evolución de la afectación de la mucosa del estómago desde la gastritis superficial a una gastritis crónica atrófica, sobre la que se asientan focos de metaplasia intestinal, que pueden evolucionar a displasia y finalmente a adenocarcinoma (72). En otros casos, sin embargo, el adenocarcinoma parece desarrollarse sobre tejido previamente sano.

Algunos estudios han encontrado también una asociación entre la infección por *H. pylori* y otros tumores como el colorrectal (73,74), el de páncreas (75–78), vías biliares (79), pulmón (80) o laringe (81), aunque el grado de evidencia que sustenta estas asociaciones es menor que para el cáncer de estómago o el linfoma tipo MALT. Según el último informe publicado por la IARC sobre el tema (27), existe evidencia suficiente acerca de la asociación causal de la infección crónica por *H. pylori* solo con el cáncer gástrico no-cardias y con el linfoma gástrico de bajo grado de células B tipo MALT.

Además de con enfermedades neoplásicas, la infección por *H. pylori* se ha relacionado con otros tipos de patologías, principalmente alérgicas o con un componente autoinmune en su etiología. En estas asociaciones, en algunos casos el papel de la infección se ha descrito como factor de riesgo y en otros como factor protector, aunque hasta el momento no se ha podido establecer de forma sólida una relación causal con ninguna de ellas (82).

### 1.3.4. Diagnóstico y tratamiento de la infección

Se dispone de distintos métodos de **diagnóstico** de la infección por *H. pylori*, que pueden agruparse en invasivos y poco invasivos en función de si requieren o no la realización de una endoscopia (83–85).

- Métodos diagnósticos poco invasivos:
  - o Detección de anticuerpos: consiste en la detección de anticuerpos IgG, IgA o IgM frente a *H. pylori* en el suero, principalmente mediante la técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA). Aunque existen pruebas para la detección de anticuerpos en orina o saliva, no existe evidencia suficiente sobre su utilidad diagnóstica. La principal limitación de la detección de anticuerpos como método diagnóstico radica en la incapacidad para diferenciar la infección activa de la pasada. Sin embargo este método diagnóstico resulta apropiado para la realización de estudios epidemiológicos poblacionales, por ser relativamente fácil de realizar en muchas personas, especialmente en personas sin patología en las que no estaría indicado realizar una endoscopia, y por no verse afectado su resultado por el

consumo reciente de fármacos antimicrobianos o inhibidores de la bomba de protones.

Recientemente se han desarrollado técnicas de diagnóstico serológico, como la serología múltiplex, que permiten cuantificar en un solo ensayo anticuerpos frente a varios antígenos bacterianos. Aunque estas técnicas no están incorporadas en la práctica clínica, pueden ser de gran utilidad en la investigación epidemiológica (86).

- Prueba del aliento: consiste en la medición de los niveles de CO<sub>2</sub> marcado con C<sup>13</sup> o C<sup>14</sup> en el aire espirado tras la ingesta de urea marcada con dichos isótopos. Tiene una sensibilidad y especificidad altas, y es considerada la prueba diagnóstica no invasiva de elección en la mayor parte de los casos.
  - Detección de antígeno en heces: se trata de una técnica basada en la utilización de anticuerpos monoclonales, principalmente mediante enzimoimmunoanálisis o inmunocromatografía.
  - Métodos moleculares: se han desarrollado algunas pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN bacteriano en heces, aunque aún no hay evidencia suficiente sobre su utilidad diagnóstica.
- Métodos diagnósticos invasivos:
- Test rápido de la ureasa: consiste en poner en contacto una muestra de biopsia gástrica con una solución o un gel de urea, de tal modo que en presencia de la ureasa de *H. pylori* se produce un cambio de color. La prueba tiene una sensibilidad entorno al 90% y una especificidad del 95-100%. Su principal ventaja es la rapidez en la obtención del resultado.
  - Estudio histológico de una muestra de tejido gástrico: consiste en la identificación al microscopio de la presencia de la bacteria mediante técnicas histoquímicas o inmunohistoquímicas.
  - Cultivo: consiste en cultivar microorganismos aislados en una muestra de biopsia gástrica. Permite no solo el diagnóstico de la infección sino también evaluar el patrón de sensibilidad a los antimicrobianos.
  - Métodos moleculares: técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa como la PCR en tiempo real o la PCR en tiempo real cuantitativa han mostrado buenos resultados de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la presencia de *H. pylori* en muestras de biopsias tomadas de la mucosa del estómago. Además permiten la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos.

En cuanto al **tratamiento** de la infección, el último informe del Consenso de Florencia/Maastricht V, publicado en 2016, recomienda tratar a todas las personas que son diagnosticadas de una infección por *H. pylori* (85). La elección del tratamiento debe tener en cuenta la presencia de resistencias antimicrobianas, así como el riesgo de desarrollarlas. Estudios recientes ponen de relieve una tendencia creciente en la prevalencia de cepas de *H. pylori* resistentes a diversos antimicrobianos, así como un descenso en las tasas de erradicación de la infección alcanzadas con las pautas de tratamiento habituales (87). La OMS ha incluido la infección por *H. pylori* resistente a la claritromicina entre las bacterias con prioridad alta para la investigación y el desarrollo de nuevos agentes antibióticos (88).

Las recomendaciones de la IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *H. pylori* establecen como primera línea de tratamiento la cuádruple terapia con un inhibidor de la bomba de protones, claritromicina, amoxicilina y metronidazol durante 14 días (89).

Una actualización reciente de las Guías para el manejo de la infección por *H. pylori* en niños y adolescentes de la *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* y la *North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* recomiendan la realización de pruebas diagnósticas para la detección de la infección únicamente si en caso de obtener un resultado positivo estaría indicado y se realizaría el tratamiento erradicador; recomiendan no seguir la estrategia de “diagnosticar y tratar” (denominada “*test and treat*” en la literatura anglosajona), así como modificar las pautas de tratamiento de primera línea y una mayor disponibilidad de las técnicas para el diagnóstico de resistencias de cara a personalizar el tratamiento erradicador (90).

Además de la aparición de resistencias antimicrobianas, otros aspectos a tener en cuenta a la hora de instaurar el tratamiento erradicador son la aparición de eventos adversos, así como el cumplimiento terapéutico, que se ve dificultado tanto por dichos eventos adversos como por la pauta y la duración del tratamiento.

#### **1.4. Relación entre la infección crónica por *H. pylori* y el cáncer gástrico**

El potencial carcinogénico de la infección crónica por *H. pylori* fue establecido por la IARC ya en su informe de 1994 (91). La asociación con el cáncer gástrico parece darse casi exclusivamente con el cáncer gástrico no-cardias, es decir el localizado distal a la unión esofagogástrica, mientras que la infección no parece aumentar el riesgo de cáncer de cardias. Por tipo histológico, siguiendo la

clasificación de Laurén que diferencia los tipos intestinal, difuso y mixto, en un principio la infección por *H. pylori* se asoció preferentemente con la aparición de adenocarcinomas de tipo intestinal. Sin embargo, en la actualidad no hay un acuerdo unánime sobre si existen diferencias en el riesgo asociado a la infección crónica por *H. pylori* en función del tipo histopatológico (92). El adenocarcinoma tipo intestinal se suele desarrollar a partir de una gastritis crónica atrófica, tras pasar por una serie de alteraciones histológicas. La observación de estas alteraciones llevó en 1975 a Correa *et al.* a proponer un modelo etiopatogénico para el cáncer gástrico (93). Según la cascada de alteraciones recogidas en este modelo, en primer lugar se produce la pérdida de glándulas secretoras, dando lugar a una atrofia gástrica multifocal, la cual puede ir seguida de la aparición de una lesión histológica denominada metaplasia intestinal, caracterizada por la sustitución de las células glandulares gástricas por otras de apariencia semejante a las del epitelio intestinal. Estas áreas de metaplasia pueden progresar a displasia, lesión premaligna caracterizada por la aparición de atipias en los núcleos celulares y alteración de la arquitectura tisular. Por último, la displasia puede progresar a un adenocarcinoma invasivo. La progresión de estas lesiones se cree que tiene lugar a lo largo de varias décadas, aunque el tiempo de evolución es variable de unas personas a otras (94). Por su parte, los adenocarcinomas de tipo difuso, a diferencia de los de tipo intestinal, no parecen seguir esta evolución progresiva y pueden aparecer sobre zonas previamente sanas de la mucosa gástrica (95).

Actualmente se considera que las lesiones iniciales de este proceso, incluidas la gastritis crónica no atrófica y la gastritis atrófica son reversibles tras la erradicación de la infección, mientras que la metaplasia intestinal ya no parece ser reversible, aunque se acepta que en algunos casos el tratamiento erradicador de la infección por *H. pylori* puede detener su progresión (85).

Los mecanismos moleculares por los que la infección crónica por *H. pylori* puede dar lugar a un adenocarcinoma gástrico no son del todo conocidos, si bien existen numerosos estudios, principalmente *in vitro* pero también *in vivo*, que muestran el efecto de la infección en diversas vías de señalización celular relacionadas con el proceso de carcinogénesis como la proliferación celular, las modificaciones del ADN (tanto estructurales como epigenéticas) y la transición epitelio-mesenquimal (27,96). Los efectos sobre estas vías se han atribuido a productos derivados de la inflamación crónica, como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como a un efecto directo de la propia bacteria y sus mecanismos de virulencia. También se ha planteado la hipótesis de que la hipoclorhidria que tiene lugar en algunos casos de infección por *H. pylori* puede favorecer la colonización del estómago por otras bacterias, que darían lugar a un aumento en la producción de N-nitrosaminas, sustancias para las cuales se ha descrito un potencial genotóxico (27).

A pesar del papel fundamental de la infección crónica por *H. pylori* en la aparición del cáncer gástrico, en la mayor parte de las personas infectadas la infección se mantiene como una gastritis crónica no atrófica. El desarrollo de un adenocarcinoma depende de la participación de otros factores, relacionados con características de la persona, de la bacteria y del ambiente, así como de la interacción entre ellos. En los apartados siguientes se exponen algunos de estos factores.

### 1.4.1. Factores del huésped

Los factores del huésped más estudiados en relación con el riesgo de cáncer gástrico son la edad, el género, la etnia o la raza y factores genéticos.

El riesgo de cáncer gástrico se incrementa con la **edad**, habiéndose estimado que, a nivel mundial, el riesgo de desarrollar esta enfermedad entre el nacimiento y los 49 años es del 0,17% en hombres y 0,11% en mujeres y asciende hasta un 1,95% y 0,76%, respectivamente entre los 70 y 79 años (7).

El **género** se asocia con el riesgo de cáncer gástrico, siendo la incidencia aproximadamente el doble en hombres que en mujeres. A su vez, aunque con menos consistencia entre estudios, la prevalencia de infección por *H. pylori* también parece ser algo superior en hombres que en mujeres (53). A la diferente incidencia de cáncer gástrico en función del género podrían estar contribuyendo una mayor prevalencia entre los hombres de otros factores de riesgo de cáncer gástrico, como el consumo de tabaco y de alcohol, así como una mayor susceptibilidad frente al potencial carcinogénico de la infección por *H. pylori*. Esta potencial mayor susceptibilidad podría estar mediada por factores genéticos y hormonales, además de por posibles interacciones con determinados hábitos de vida.

También se han identificado diferencias en la incidencia de cáncer gástrico entre distintos **grupos étnicos o razas**. En estudios realizados en EEUU, la incidencia es mayor en personas de raza negra, hispanas y asiáticas que en personas de raza blanca no hispanas (97). Al igual que en el caso del género, a las diferencias entre razas también pueden estar contribuyendo factores genéticos, ambientales y de estilos de vida.

Dentro de los **factores genéticos**, algunos de los más estudiados son los relacionados con la respuesta inflamatoria, bajo la hipótesis de que el tipo de respuesta inmune e inflamatoria frente a la infección por *H. pylori* es uno de los factores que influyen en la evolución de la misma. Varios polimorfismos en genes relacionados con la respuesta inflamatoria y la secreción ácida del estómago, como los que codifican para la interleucina 1 $\beta$  (*IL-1B*), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$



(*TNF- $\alpha$* ), la IL-6, la IL-8, la IL-10, el receptor tipo Toll 4 (*TLR4*) y el factor de crecimiento transformador  $\beta$  (*TGF- $\beta$* ) se han asociado con el riesgo de evolución a cáncer gástrico.

Otro factor que está cobrando relevancia en los últimos años por su posible papel en el desarrollo de tumores gástricos es la **microbiota** gastrointestinal. Algunos estudios han observado diferencias en la microbiota gástrica e intestinal entre personas con cáncer gástrico y personas sin dicha enfermedad y han postulado la hipótesis de que por una parte, la infección por *H. pylori* y los cambios asociados a la atrofia de la mucosa gástrica, como el aumento del pH, pueden modificar la composición de la microbiota gástrica favoreciendo el crecimiento de especies con mayor poder carcinogénico, y por otra parte, la microbiota puede promover una mayor virulencia de *H. pylori* (98–100). La presencia de diferentes bacterias puede modular el tipo de respuesta inmune, haciendo que esta sea predominantemente liderada por linfocitos T-helper tipo 1, tipo 2, tipo 17 o linfocitos T-reguladores, lo cual influye en el tipo y la intensidad de la inflamación de la mucosa gástrica (101).

#### 1.4.2. Factores de la bacteria

Se han descrito diferencias en la patogenicidad de distintas cepas de *H. pylori*. Se considera que contribuyen a esta patogenicidad los mecanismos que permiten a la bacteria sobrevivir ante las barreras defensivas del huésped y colonizarlo, así como los mecanismos de virulencia propiamente dichos, que ocasionan el daño celular y tisular (102).

Entre los factores que se han relacionado con la **supervivencia** de la bacteria en el ser humano se encuentran los siguientes:

- La enzima ureasa, que le permite sobrevivir en el medio ácido del estómago. La ureasa de *H. pylori* se caracteriza por tener dos subunidades, la subunidad A y la B. Transforma la urea en amonio, consiguiendo aumentar el pH que rodea a la bacteria, lo cual favorece su supervivencia.
- La catalasa, que contribuye a la eliminación de los radicales libres generados durante la respuesta inflamatoria, reduciendo o evitando de este modo su efecto tóxico sobre la bacteria.
- La proteína VacA, que se ha implicado, entre otras acciones, en la evasión del sistema inmune por parte de *H. pylori*, permitiéndole mantenerse como una infección crónica en el ser humano (70).

Los factores que se han asociado con la **colonización** gástrica por parte de *H. pylori* incluyen:

- Proteínas que favorecen la motilidad, como las que forman el/los flagelo/s y que le permiten atravesar la capa de moco que recubre el epitelio de la mucosa gástrica, como FlaA.
- Proteínas que favorecen la adhesión de la bacteria a las células epiteliales, como BabA (*blood group antigen binding adhesin*), SabA (*sialic acid-binding adhesin*) y OipA (*outer inflammatory protein*).
- Proteínas que modulan la respuesta inmune, como NapA (*Neutrophil activating protein*) que favorece la polarización hacia una respuesta predominantemente T helper tipo 1, o como Omp y HpaA, que inducen la maduración de las células dendríticas y modulan la presentación de antígenos (70,103).

Dentro de los factores **patogénicos**, se han identificado dos citotoxinas, CagA y VacA (102). Aproximadamente el 60% de las cepas de *H. pylori* en los países europeos producen la citotoxina CagA, la cual se ha asociado con un incremento en el riesgo de gastritis atrófica y de adenocarcinoma gástrico. El gen que codifica para esta proteína se encuentra en la isla de patogenicidad *cag*, que codifica además para distintas proteínas que forman un sistema secretor tipo IV, que contribuye a la introducción de la citotoxina CagA en el interior de las células epiteliales donde ejerce un papel oncogénico mediante la alteración de las vías de señalización celular.

La proteína VacA es sintetizada por todas las cepas de la bacteria, si bien en función del tipo de alelos presentes en varias regiones del gen *vacA* (regiones s, i y m), la actividad de la proteína varía. Las cepas s1i1m1 se han asociado con un riesgo mayor de cáncer gástrico en comparación con las cepas s2i2m2.

Por su parte, la proteína HP231, además de en funciones relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis del sistema redox y la movilidad de la bacteria, se ha implicado en una acción facilitadora de la actividad de los factores de virulencia antes mencionados, CagA y VacA (104).

#### **1.4.3. Factores ambientales**

El papel de los factores ambientales en la etiología del cáncer gástrico se conoce desde hace décadas, a partir de los estudios que describieron un cambio en el riesgo de las segundas generaciones de emigrantes en los EEUU, cuyos progenitores provenían de regiones de alta prevalencia de cáncer, principalmente del sudeste asiático. Aunque en ese momento se desconocía el papel central de la infección crónica por *H. pylori* en la patología gástrica, determinados estudios de epidemiología descriptiva pusieron de manifiesto la importancia de las exposiciones ambientales en la infancia en el riesgo posterior de desarrollar cáncer gástrico en la edad adulta (105).

Cuando hablamos de factores ambientales nos referimos a un amplio conjunto de exposiciones diversas, incluyendo el consumo de tabaco, de alcohol, o factores relacionados con la dieta, así como la exposición a contaminantes presentes en el aire o el agua o a agentes infecciosos, como el VEB.

La **interacción** entre los distintos factores, aunque poco estudiada, se cree que puede jugar un papel importante en el potencial carcinogénico de la infección. Por ejemplo, algunos estudios han encontrado un riesgo mayor de cáncer gástrico asociado a la infección por *H. pylori* en fumadores que en no fumadores, aunque este hallazgo no ha sido replicado en otros estudios (27). También se ha observado una posible interacción entre determinados factores dietéticos y la infección por *H. pylori*. La ingesta de ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol no se asoció, en un estudio de casos y controles realizado en Suecia, con el riesgo de cáncer gástrico no-cardias en personas seronegativas para *H. pylori*, mientras que en personas *H. pylori* positivas una ingesta más alta de estos antioxidantes se asoció con una reducción del riesgo (106). La ingesta de carnes procesadas se asoció, en un estudio de casos y controles llevado a cabo en Hawaii, con un aumento de riesgo de cáncer gástrico no-cardias en personas *H. pylori* seropositivas, mientras que no se observó un efecto estadísticamente significativo en las personas *H. pylori* negativas (107).

### 1.5. Relación entre la infección crónica por *H. pylori* y el cáncer colorrectal

La relación de la infección por *H. pylori* con el cáncer colorrectal ha sido menos estudiada que con el cáncer gástrico. Los estudios publicados que presentan resultados acerca de esta posible asociación son principalmente estudios de casos y controles, muchos de ellos con controles de base hospitalaria llevados a cabo en centros de realización de colonoscopias, y algunos estudios de cohortes retrospectivos. Los hallazgos de estos estudios se han sintetizado en varios metanálisis (108–115), que han estimado unos OR para la asociación de la infección por *H. pylori* con el cáncer colorrectal entre 1,08 [IC95%: 0,89-1,68] y 1,63 [IC95%: 1,39-1,90], apuntando hacia un posible aumento de riesgo asociado a la infección. Sin embargo, como los propios autores de estos metanálisis señalan, la heterogeneidad entre los estudios primarios incluidos, las limitaciones metodológicas de algunos de ellos y la posible existencia de un sesgo de publicación hacen que aún exista incertidumbre acerca de esta posible relación.

Los mecanismos que se han propuesto para explicar un posible aumento de riesgo de cáncer colorrectal asociado a la infección por *H. pylori* contemplan principalmente tres vías (116–118):

- **Hipergastrinemia:** la infección crónica de la mucosa gástrica por *H. pylori* da lugar un aumento de la secreción de gastrina. A esta hormona se le ha atribuido un efecto

proliferativo sobre las células epiteliales del colon, lo cual ha llevado a la hipótesis de que la hipergastrinemia asociada a la infección por *H. pylori* podría dar lugar a un aumento en el riesgo de cáncer colorrectal.

- **Modificación de la microbiota intestinal:** la modificación del pH gástrico ocasionada por la infección crónica por *H. pylori* puede dar lugar a un sobrecrecimiento de otras bacterias, que pasarían al intestino. Asimismo, la propia presencia de *H. pylori* podría desplazar, por competición, a bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal. Cambios en la composición de la microbiota se han postulado como un posible mecanismo implicado en el desarrollo de cáncer colorrectal.
- **Inflamación crónica:** las sustancias generadas en el contexto de la inflamación crónica de la mucosa gástrica ocasionada por la presencia de *H. pylori* podrían tener un efecto a nivel sistémico, incluido un efecto sobre la mucosa colorrectal. El aumento de riesgo de cáncer colorrectal asociado a determinadas patologías inflamatorias como la enfermedad de Chron y la colitis ulcerosa, así como la reducción de riesgo de este tumor asociada al consumo de antiinflamatorios no esteroideos apoyarían esta hipótesis.

#### 1.6. Marcadores serológicos de riesgo de cáncer gástrico y colorrectal

Diversos grupos de investigación han tratado de identificar marcadores serológicos de riesgo de cáncer gástrico y, en menor medida de cáncer colorrectal, que sean poco invasivos y permitan identificar subgrupos de población con mayor riesgo de desarrollar estos tumores.

En el caso del cáncer gástrico, la mayoría de los investigadores se ha centrado en la identificación de marcadores serológicos de la presencia de lesiones precursoras del cáncer, principalmente la gastritis crónica atrófica. En este sentido, los niveles de pepsinógeno I, pepsinógeno II, la razón pepsinógeno I/pepsinógeno II y los niveles de gastrina son los más estudiados en la literatura científica, habiendo demostrado una aceptable correlación con los hallazgos endoscópicos e histológicos. Sin embargo el valor predictivo positivo de estos indicadores sigue siendo bajo, limitando su utilidad como cribado poblacional.

Con respecto a los marcadores serológicos relacionados con la infección por *H. pylori*, los más estudiados son la presencia de anticuerpos frente a la citotoxina CagA, y en menor medida frente a VacA. Aunque ambos marcadores se han asociado en la mayor parte de los estudios con un riesgo mayor de cáncer gástrico no-cardias, su valor predictivo positivo es bajo, por lo que se han puesto en marcha estudios de investigación que tratan de identificar marcadores adicionales que mejoren la capacidad predictiva.

La serología múltiple es una técnica que permite cuantificar de manera simultánea y en un número elevado de muestras, anticuerpos frente a varios antígenos. Estas características la hacen especialmente apropiada para su utilización en estudios epidemiológicos con un número elevado de participantes, y para el análisis simultáneo de diversos marcadores. Recientemente se ha adaptado esta técnica para el análisis de hasta 16 antígenos de *H. pylori*, lo cual permite estudiar más en profundidad la respuesta serológica frente a la infección que las técnicas tradicionales, como el ELISA o el Western-blot, que detectan anticuerpos frente a un número limitado de antígenos, o bien frente a un conjunto de diversos antígenos sin diferenciarlos individualmente. La serología múltiple para *H. pylori* ha sido utilizada en estudios epidemiológicos realizados en otras poblaciones, como Alemania, China, Irán o EEUU, pero no en España.

Dentro de los estudios que han analizado la respuesta serológica frente a múltiples proteínas de la bacteria en un mismo ensayo, se observa cierta heterogeneidad entre sus resultados, no habiéndose identificado un patrón común a todos ellos. En el estudio de Gao *et al.*, llevado a cabo en Alemania, la seropositividad frente a CagA y GroEL se asoció, de forma independiente del serostatus frente a otras proteínas, con el riesgo de cáncer gástrico no-cardias (119). Song *et al.* encontraron una asociación positiva con el cáncer gástrico para la seropositividad frente a 11 de las 17 proteínas analizadas en una muestra de población adulta de Suecia. En este estudio además identificaron dos patrones de respuesta de anticuerpos frente a *H. pylori*, ambos relacionados con un riesgo mayor de adenocarcinoma gástrico no-cardias (120). Por su parte, Epplein *et al.* encontraron, en una población de hombres de Shanghai, una asociación estadísticamente significativa entre la seropositividad frente a seis de las 15 proteínas estudiadas y el riesgo de cáncer gástrico no-cardias (121). En una población procedente de otra región de China, Murphy *et al.* también hallaron una asociación positiva con la seropositividad frente a seis de las 15 proteínas estudiadas, aunque las proteínas que mostraron dicha asociación no fueron las mismas que en el estudio de Epplein *et al.* Por otra parte encontraron una asociación inversa entre la seropositividad frente a CagM y el riesgo de cáncer gástrico no-cardias (122). En población iraní, Shakeri *et al.* estimaron un riesgo de cáncer gástrico no-cardias mayor en presencia de seropositividad frente a CagA y frente a VacA, y un riesgo menor en presencia de seropositividad frente a GroEL y NapA (123).

En el caso del cáncer colorrectal, la investigación en este campo es más escasa, probablemente como consecuencia, por una parte, de que ya se dispone de pruebas de cribado poblacional efectivas para la prevención primaria y secundaria de este tumor, como el test de sangre oculta en heces y la colonoscopia, y por otra, por el hecho de que la asociación entre el cáncer colorrectal y la infección por *H. pylori* no está del todo establecida. Dos estudios han publicado resultados

acerca de la asociación entre marcadores serológicos frente a diversas proteínas de *H. pylori* cuantificados mediante serología múltiple y el riesgo de cáncer colorrectal. Epplein *et al.* encontraron, en una población predominantemente afroamericana y de recursos económicos bajos de EEUU, un riesgo mayor de dicho cáncer asociado a la seropositividad frente a cinco de las 15 proteínas de *H. pylori* analizadas (124). Por su parte, en el estudio de Blase *et al.*, llevado a cabo en otra población también en EEUU, solo se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el riesgo de cáncer colorrectal y la seropositividad frente a GroEL (125).

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

---

## 2. Justificación del estudio

La infección crónica por *H. pylori* es el principal factor de riesgo conocido para el desarrollo del cáncer gástrico no-cardias y se ha propuesto como un posible factor de riesgo de cáncer colorrectal, los cuales son causas importantes de morbilidad tanto en España como en muchas otras regiones del mundo. Sin embargo, la mayoría de las personas infectadas por esta bacteria no desarrollan ninguna de estas enfermedades, por lo que identificar los factores que influyen en la evolución de la infección crónica al cáncer gástrico, así como profundizar en la posible asociación con el cáncer colorrectal podría ayudar a optimizar las estrategias de prevención primaria y secundaria de estos tumores.

Se ha estimado que la prevalencia de infección por *H. pylori* a nivel mundial se encuentra alrededor del 50%, a pesar de una tendencia decreciente en las últimas décadas. Se han descrito marcadas diferencias geográficas tanto en la prevalencia global como en el tipo de cepas más frecuentes en las distintas regiones del mundo. La información disponible sobre la prevalencia de la infección por *H. pylori* en España es limitada, proveniente principalmente de estudios locales y algunos de ellos realizados hace más de 20 años. Esto hace que los datos disponibles puedan no ser representativos de la situación actual.

*H. pylori* es una bacteria caracterizada por una elevada diversidad genética. Las distintas cepas de *H. pylori* y la diferente expresión de proteínas pueden dar lugar a diferencias en su patogenicidad y conllevar por tanto mayor o menor riesgo de desarrollar distintas enfermedades asociadas a la infección, entre ellas el cáncer gástrico.

El trabajo de la presente tesis se centra en los marcadores serológicos de la respuesta de anticuerpos frente a *H. pylori*, los cuales son el resultado de la interacción entre el tipo de cepa/s que colonizan el estómago de cada persona y la respuesta inmune de esta frente a dicha infección. Analizaremos la asociación entre la respuesta serológica frente a la infección mediante la cuantificación de la reactividad de los anticuerpos frente a distintas proteínas de la bacteria y el riesgo de cáncer gástrico y de cáncer colorrectal.

Los resultados acerca de la asociación con el cáncer gástrico podrían contribuir a identificar y cuantificar el riesgo asociado a determinados patrones de respuesta serológica frente a la infección por *H. pylori* en la población estudiada. Además, sumados al cuerpo de evidencia existente a partir de estudios realizados en otros ámbitos geográficos, podrían contribuir a entender mejor dicha asociación y a identificar proteínas de esta bacteria que pudieran tener un papel en el proceso de



---

carcinogénesis gástrica y que, por lo tanto, podrían ser objeto interesante de trabajos de investigación básica que ayudasen a conocer mejor sus mecanismos de acción.

En cuanto a la asociación de la respuesta de anticuerpos frente a *H. pylori* con el cáncer colorrectal, dado que no existe acuerdo entre los distintos estudios publicados sobre la existencia de dicha asociación, los resultados de la tesis aportarán datos nuevos que podrían contribuir a esclarecer el papel de esta infección en el cáncer colorrectal.

Además, en esta tesis presentamos una visión más actual y detallada de la seroprevalencia de la infección en España y aportamos información sobre la respuesta de anticuerpos frente a 16 proteínas de la bacteria. Esta sería la primera aproximación a la caracterización de la respuesta serológica frente a diversas proteínas de *H. pylori* en esta población, incluyendo los principales factores de virulencia reconocidos (CagA y VacA).

Profundizar en la comprensión de la relación entre los factores infecciosos y el cáncer tiene especial interés desde el punto de vista de la salud pública, ya que se trata de factores prevenibles o tratables y por lo tanto posibles objetos de intervenciones encaminadas a la prevención del cáncer.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 3. Hipótesis y objetivos

#### Hipótesis

Las hipótesis que se plantea contrastar en la presente tesis son:

- Existen patrones de respuesta de anticuerpos frente a distintas proteínas de *H. pylori* que se asocian con diferencias en el riesgo de cáncer gástrico no-cardias.
- La respuesta serológica de anticuerpos frente a distintas proteínas de *H. pylori* es un marcador de riesgo de cáncer colorrectal.
- La seroprevalencia de infección por *H. pylori* y el patrón de respuesta de anticuerpos frente a distintas proteínas de esta bacteria presentan diferencias en función de la edad, el sexo y el lugar de nacimiento en población residente en España.

#### Objetivos

1. Estimar el riesgo de cáncer gástrico de cardias y no-cardias asociado a la respuesta de anticuerpos frente a 16 proteínas de *H. pylori*.
2. Identificar, dentro del grupo de personas seropositivas para la infección por *H. pylori*, la posible existencia de patrones de respuesta serológica frente a varias proteínas que permitan definir subgrupos de población que presenten un riesgo especialmente alto o bajo de cáncer gástrico.
3. Evaluar si existe una asociación entre la respuesta de anticuerpos frente a cada una de las proteínas de *H. pylori* analizadas y el riesgo de cáncer colorrectal.
4. Evaluar posibles diferencias en la asociación entre la respuesta de anticuerpos frente a *H. pylori* y el riesgo de cáncer colorrectal en función de la localización del tumor (colon derecho, colon izquierdo o recto).
5. Estimar la seroprevalencia de infección por *H. pylori* y la seropositividad frente a 16 proteínas de la bacteria en una muestra de la población española y su variabilidad en función de la edad, el sexo y el lugar de nacimiento.

## **4. METODOLOGÍA GENERAL Y PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS COMPENDIADOS**

---

#### 4. Metodología general y presentación de los trabajos compendiados

Para alcanzar los objetivos establecidos y contrastar de este modo las hipótesis planteadas se llevaron a cabo tres trabajos, a partir de un estudio epidemiológico de casos y controles, el estudio MCC-Spain (<http://www.mccspain.org/>). Este estudio, realizado en varias comunidades autónomas, es un proyecto estratégico del CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP).

A continuación se presenta un resumen de la metodología del estudio MCC-Spain, común para los tres trabajos compendiados, seguido de un resumen de los aspectos metodológicos específicos de cada uno de ellos.

##### MCC-Spain

El estudio MCC-Spain se diseñó y se puso en marcha con el objetivo de conocer mejor la influencia de factores ambientales y su interacción con factores genéticos en cinco tipos de cáncer: mama, colorrectal, estómago, próstata y leucemia linfática crónica (126). Es un estudio multicéntrico, multicaso-control con controles poblacionales en el que participan 23 hospitales de 12 provincias (Asturias, Barcelona, Cantabria, Gipuzkoa, Girona, Granada, Huelva, León, Madrid, Murcia, Navarra y Valencia). Para alcanzar los objetivos propuestos se recogió información mediante un cuestionario epidemiológico sobre la exposición, a lo largo de la vida de cada sujeto participante, a diversos factores de riesgo potenciales, relacionados con la ocupación laboral, el lugar de residencia, los hábitos de vida y el consumo de fármacos. El cuestionario incluyó también preguntas acerca de los antecedentes personales y familiares de diversas patologías, historia reproductiva, y características sociodemográficas. La administración del cuestionario se realizó mediante entrevista presencial por parte de personal entrenado para ello. Mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos autocumplimentado se recogió información sobre la dieta de los participantes. Además se extrajeron muestras biológicas (sangre, orina, pelo y uñas) para la determinación de diversos marcadores de exposición. En una muestra de 281 casos de cáncer de estómago, 1.488 de colon o recto y en 2.555 controles se determinó la respuesta de anticuerpos frente a 16 antígenos de *H. pylori* mediante serología múltiple.

El estudio fue aprobado por los Comités de Ética de la Investigación de las instituciones participantes, y todas las personas que aceptaron participar en el mismo firmaron un consentimiento informado.

El periodo de reclutamiento de participantes para el estudio se extendió desde septiembre de 2008 hasta diciembre de 2013. Los criterios de inclusión comunes para los casos y los controles fueron

tener una edad entre 20 y 85 años, haber residido en el área de reclutamiento durante al menos los 6 meses previos al diagnóstico (para los casos) o al reclutamiento (para los controles) y tener capacidad para responder al cuestionario epidemiológico. La selección de los casos se realizó a partir de los casos incidentes diagnosticados durante el periodo de reclutamiento en los hospitales participantes, excepto los casos de leucemia linfática crónica, que podían ser casos prevalentes. Se incluyeron solo los casos con confirmación histológica. En cada provincia se reclutaron casos de al menos dos tipos de cáncer. Se incluyó un grupo común de controles para todos los tipos de tumor. Los controles se seleccionaron de forma aleatoria a partir de las listas de población asignada a los centros de atención primaria participantes de las áreas de referencia de los hospitales incluidos en el estudio. Se realizó un apareamiento por frecuencia de edad (intervalos de 5 años) y sexo de los controles con respecto a los casos incluidos en cada provincia.

A los participantes que aceptaron donar una muestra de sangre se les extrajeron entre 18,5 y 27 ml, que se mantuvieron refrigerados a 4°C hasta su procesamiento, el cual tuvo lugar en las primeras 48 horas tras la extracción. Las muestras se separaron en sangre completa, plasma, fracción celular y suero, se alicuotaron y se mantuvieron congeladas a -80°C. Una de las alícuotas de 500 µl de suero fue destinada al análisis de la presencia de anticuerpos frente a *H. pylori*, el cual se realizó mediante la tecnología de serología múltiple en el laboratorio de la División de Diagnóstico Molecular de Infecciones Oncogénicas del Programa de Infección, Inflamación y Cáncer del Centro Alemán de Investigación en Cáncer (*German Cancer Research Center, DKFZ*).

### **Serología múltiple para *H. pylori***

La serología múltiple para *H. pylori* es una técnica que permite cuantificar, en un mismo ensayo, la reactividad de los anticuerpos frente a varias proteínas de la bacteria y en un número elevado de muestras. Se basa en la combinación de un ensayo de inmunoabsorción de Glutathion S-Transferasa (GST) y la tecnología de microesferas fluorescentes. Como antígenos se utilizan proteínas recombinantes expresadas por bacterias fusionadas con GST. Las proteínas de fusión se purifican y se acoplan a las distintas microesferas de poliestireno unidas previamente a glutatión-caseína y marcadas con fluorescencia (SeroMap, Luminex, Austin, Texas). Las microesferas, cada una con su antígeno y su fluorescencia específica, se mezclaron e incubaron con las muestras de suero a una dilución 1:100. Los anticuerpos unidos a las microesferas a través de los antígenos bacterianos se marcan mediante anticuerpos dirigidos frente a inmunoglobulinas humanas tipo A, M y G biotinilados (Dianova, Hamburgo, Alemania) y mediante estreptavidina-R-ficoeritrina. Las microesferas fueron analizadas mediante citometría de flujo con un analizador Luminex 200 que cuantifica la unión de los anticuerpos a los antígenos bacterianos a partir de la mediana de la

intensidad de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de la R-ficoeritrina en al menos 100 microesferas del mismo color interno. Se sustrajo la actividad de fondo de cada microesfera y la de la GST y de esta forma se obtuvieron los valores netos de la mediana de la intensidad de la fluorescencia.

Mediante esta técnica se cuantificó la reactividad de anticuerpos frente a 16 proteínas de *H. pylori*: GroEL (HP10), UreA (HP73), HP231, NapA (HP243), HP305, HpaA (HP410), Cag $\delta$  (HP522), CagM (HP537), CagA (HP547), HyuA (HP695), Catalasa (HP875), VacA (HP887), HcpC (HP1098), Cad (HP1104), Omp (HP1564) y HomB. Estas proteínas habían sido seleccionadas para ser incluidas en la técnica por estar localizadas en la superficie de la bacteria y haber mostrado ser inmunogénicas en ensayos de *immunoblot* en dos dimensiones (UreA, HP231, NapA, HpaA, CagA, Catalasa y VacA), por haber mostrado en estudios previos asociación serológica con el cáncer gástrico (GroEL, HyuA, Cad, HcpC y Omp) y/o con la úlcera gástrica (HP305 y CagM), o por haber sido reconocidas específicamente en sueros positivos frente a *H. pylori* (Cag $\delta$  y CagM). Para cada una de ellas se estableció un punto de corte a partir de los resultados obtenidos en 17 muestras de suero analizadas en el mismo ensayo y que había sido clasificadas previamente como *H. pylori* negativas. El punto de corte se fijó en la media de la mediana de intensidad de la fluorescencia más tres desviaciones estándar, tras excluir los valores extremos positivos.

Se utilizó el criterio publicado previamente para esta técnica (86), por el que se clasifican como *H. pylori* positivas las muestras positivas para cuatro o más de las proteínas analizadas (excluyendo HomB, la cual se había incorporado a la técnica con posterioridad a la validación de este criterio).

A continuación se resumen los objetivos y los aspectos metodológicos específicos de cada uno de los trabajos compendiados en esta tesis. El primero de ellos aborda los objetivos 1 y 2, para lo que analiza la asociación entre la reactividad de anticuerpos frente a *H. pylori* y el cáncer gástrico; el segundo trabajo se centra en los objetivos 3 y 4, relacionados con la asociación de la respuesta serológica frente a la bacteria y el cáncer colorrectal; por último, el tercer trabajo responde al quinto de los objetivos planteados y presenta una descripción de la respuesta de anticuerpos frente a las proteínas de *H. pylori* analizadas en la muestra de controles del estudio MCC-Spain.

## **Estudio 1. Biomarcadores de riesgo de cáncer gástrico relacionados con la serología frente a *Helicobacter pylori* en el estudio de casos y controles MCC-Spain**

El objetivo principal de este trabajo fue identificar biomarcadores serológicos de infección por *H. pylori* que se relacionen con el riesgo de cáncer gástrico, diferenciando el cáncer gástrico de cardias del de no-cardias.

De todos los hospitales participantes en el estudio MCC-Spain, 15 reclutaron casos de cáncer de estómago. Estos hospitales estaban localizados en 9 provincias distintas (Asturias, Barcelona, Cantabria, Granada, Huelva, León, Madrid, Navarra y Valencia). Entre los 923 casos y 7.734 controles potencialmente elegibles identificados, participaron un total de 459 casos de cáncer gástrico y 3.440 controles, lo que supone unas tasas de respuesta del 57% y 53%, respectivamente. Para este análisis se excluyeron los controles con historia personal de cáncer de esófago o de estómago, los reclutados en provincias que no participaron en la inclusión de casos de cáncer gástrico y los que tenían una edad cinco años inferior a la del caso de cáncer gástrico más joven en la provincia correspondiente. En los participantes en los que fue posible se realizó una serología múltiple para la determinación de anticuerpos frente a *H. pylori*, disponiéndose de resultados válidos para 281 casos y 2.071 controles.

**Análisis estadístico:** para analizar la asociación entre la respuesta de anticuerpos y el cáncer gástrico se calcularon las razones de odds (OR, por sus siglas en inglés) y los correspondientes intervalos de confianza al 95% (IC 95%) mediante modelos mixtos de regresión logística multinivel con la provincia como término de efectos aleatorios y las variables siguientes como efectos fijos: edad, sexo, nivel de estudios, hábito tabáquico e historia familiar de cáncer gástrico. Este análisis se realizó en el conjunto de la muestra para estimar el efecto de la seropositividad frente a *H. pylori*, y entre los sujetos *H. pylori* positivos para analizar el efecto de la seropositividad frente a cada una de las proteínas analizadas. Para evaluar el efecto de la seropositividad frente a cada proteína independiente del efecto de las demás, se construyó un modelo de regresión logística en el que se incluyeron, además de las variables mencionadas antes, el serostatus frente a aquellas proteínas que se habían asociado con un valor  $p < 0,10$  con el riesgo de cáncer gástrico en el análisis individual previo. Por último, se realizó un análisis de componentes principales con el objetivo de identificar patrones conjuntos de reactividad frente a las distintas proteínas que se relacionase con el riesgo de cáncer gástrico. El análisis para identificar los patrones de anticuerpos se realizó en la muestra de controles. Posteriormente, se calculó el riesgo de cáncer gástrico no-cardias asociado a la puntuación en cada uno de los patrones identificados, categorizados previamente en cuartiles según su distribución en los controles.



## **Estudio 2. Reactividad de anticuerpos frente a *Helicobacter pylori* y riesgo de cáncer colorrectal en un estudio de casos y controles en España**

El objetivo de este trabajo fue evaluar la relación del cáncer colorrectal con la seropositividad global frente a *H. pylori* y con la seropositividad frente a cada una de las 16 proteínas de *H. pylori* analizadas. Se estudió también la existencia de diferencias en esta relación en función de la localización del tumor (colon derecho, colon izquierdo o recto).

De todos los hospitales participantes en el estudio MCC-Spain, 18 reclutaron casos de cáncer colorrectal, distribuidos en 11 provincias (Asturias, Barcelona, Cantabria, Gipuzkoa, Granada, Huelva, León, Madrid, Murcia, Navarra y Valencia). Entre los 3.352 casos y 7.734 controles potencialmente elegibles identificados, la tasa de respuesta fue del 68% y 53%, respectivamente (2.140 casos de cáncer colorrectal y 3.950 controles). De estos se obtuvo el resultado de la serología frente a *H. pylori* en 1.488 casos y 2.496 controles. Para este análisis se excluyeron los controles con historia personal de cáncer de colon o recto, los reclutados en la provincia que no participó en la inclusión de casos de cáncer colorrectal y los que tenían una edad cinco años inferior a la del caso más joven de cáncer colorrectal en la provincia correspondiente.

**Análisis estadístico:** se utilizaron modelos mixtos de regresión logística multivariable para estimar las OR y los correspondientes IC 95% de la asociación entre el cáncer colorrectal y la seropositividad frente a *H. pylori*. Se crearon varios modelos, todos ellos con la provincia como término de efectos aleatorios, e incluyendo progresivamente un número mayor de variables de ajuste: modelo 1, ajustado por edad, sexo y nivel de estudios; modelo 2, ajustado además por hábito tabáquico, índice de masa corporal (IMC) y antecedentes familiares de cáncer colorrectal; y modelo 3, ajustado además por consumo de alcohol, ingesta de verduras y de carne roja y procesada, y por ingesta total de energía. El análisis entre la seropositividad frente a cada proteína de forma individual y el cáncer colorrectal se realizó en los participantes clasificados como *H. pylori* positivos. Para ello se utilizaron modelos mixtos de regresión logística con la provincia como término de efectos aleatorios y la edad, sexo, nivel de estudios, hábito tabáquico y antecedentes familiares de cáncer colorrectal como términos de efectos fijos. A continuación se analizó el efecto independiente del serostatus frente a cada proteína mediante la inclusión, en un mismo modelo, de todas las que se asociaron con un valor  $p < 0,10$  en el análisis individual previo. Para las proteínas cuyo serostatus se asoció de forma estadísticamente significativa con el cáncer colorrectal, se analizó un posible efecto dosis-respuesta, para lo que se categorizó la serorreactividad en terciles en función de la distribución en los controles *H. pylori* positivos y positivos para la proteína correspondiente. Esta variable categorizada se analizó mediante modelos como los descritos anteriormente para el análisis del serostatus frente a cada proteína. Para identificar un posible efecto diferencial en función de la localización del tumor se utilizaron modelos mixtos de regresión

logística multinomial y se analizó la presencia de heterogeneidad en los efectos mediante la prueba de Wald. Se exploró la presencia de modificación del efecto en función de la edad y el sexo, para lo que la edad se dicotomizó tomando como punto de corte la mediana de la edad en los controles.

### **Estudio 3. Reactividad de anticuerpos frente a proteínas de *Helicobacter pylori* en una muestra de población adulta en España en 2008-2013**

El objetivo de este tercer trabajo fue caracterizar el patrón de reactividad de anticuerpos frente a las 16 proteínas de *H. pylori* por edad, sexo y región de nacimiento en una muestra de población adulta residente en España. Para este análisis se incluyeron los 2.555 controles correspondientes a casos de cáncer gástrico y colorrectal para los que se disponía del resultado de la serología múltiple frente a *H. pylori*.

**Análisis estadístico:** se realizaron análisis descriptivos por edad, sexo y región de nacimiento tanto para la seroprevalencia global de *H. pylori*, como para la seropositividad y serorreactividad (medida continua de la MFI) frente a cada proteína. Las diferencias entre grupos en la seroprevalencia global se analizaron mediante la prueba de la  $\chi^2$ , y en el caso de los análisis individuales por proteína, mediante modelos de regresión logística (para la seropositividad) y de regresión lineal (para la serorreactividad). Se elaboraron gráficos edad-cohorte para explorar el efecto de cada uno de estos dos componentes. Por último, se estimó la proporción de la variabilidad observada en la seropositividad frente a *H. pylori* y frente a cada proteína que era explicada por la provincia de nacimiento. Para ello se calculó el coeficiente de correlación intraclase a partir de modelos mixtos de regresión logística en los que se incluyó la comunidad autónoma de nacimiento como término de efectos aleatorios y la edad y el sexo como efectos fijos.

## 5. RESULTADOS

---

## 5. Resultados

### Estudio 1. Biomarcadores de riesgo de cáncer gástrico relacionados con la serología frente a *Helicobacter pylori* en el estudio de casos y controles MCC-Spain

La seroprevalencia de la infección frente a *H. pylori*, definida como la seropositividad frente a cuatro o más de las proteínas bacterianas analizadas, fue del 88% (IC 95%: 87-90) entre los 2.071 controles, del 95% (IC 95%: 91-98) entre los 202 casos de cáncer gástrico no-cardias y del 85% (IC 95%: 76-95) entre los 62 casos de cáncer gástrico de cardias. Los casos de cáncer no-cardias tenía un 90% mayor odds de seropositividad que los controles (OR=1,90 [IC 95%: 1,01-3,56]), y los casos de cáncer de cardias un 46% menor, aunque en este último caso de manera no estadísticamente significativa (OR=0,54 [IC 95%: 0,25-1,14]).

Entre los participantes positivos frente a *H. pylori*, la seropositividad frente a las proteínas UreA, HP231, NapA y Cag $\delta$  se asoció con un riesgo menor de cáncer gástrico no-cardias, mientras que la seropositividad frente a CagA y VacA se asoció con un riesgo mayor (Figura 5).

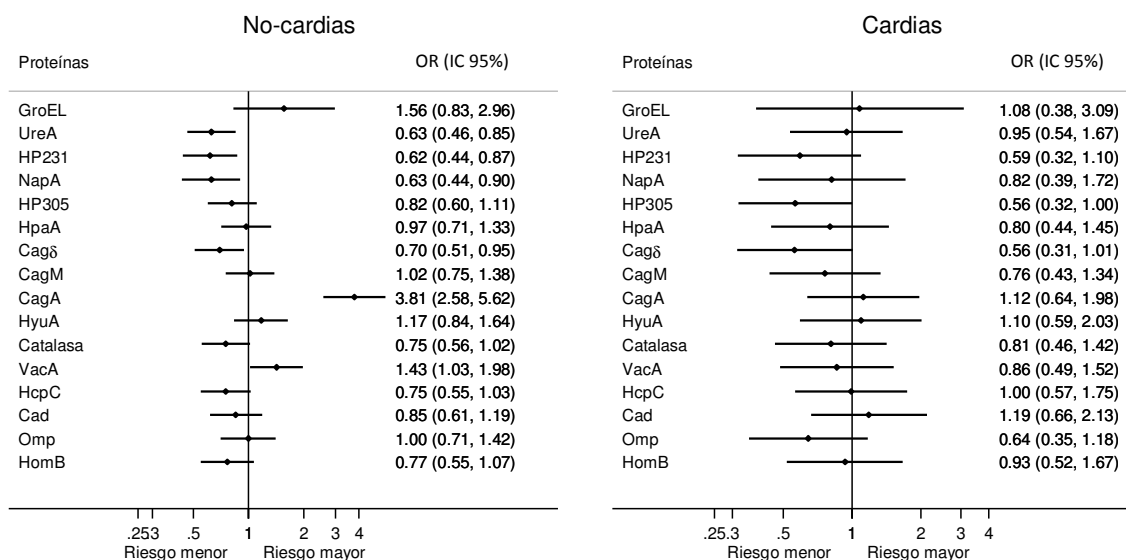


Figura 5. Asociación entre el riesgo de cáncer gástrico (no-cardias y cardias) y la positividad de anticuerpos frente a cada una de las proteínas de *H. pylori* estudiadas, entre los sujetos seropositivos para *H. pylori*. OR ajustadas por edad, sexo, nivel de estudios, antecedentes familiares de cáncer gástrico y hábito tabáquico, y con la provincia incluida como término de efectos aleatorios.

La seropositividad frente a CagA y la seronegatividad frente a Cag $\delta$  se mantuvieron asociadas con el riesgo de cáncer gástrico no-cardias tras ajustar por el serostatus frente a las demás proteínas asociadas con el riesgo de cáncer gástrico en el análisis individual (OR=3,65 [IC 95%: 2,44-5,46] y OR=0,66 [IC 95%: 0,47-0,92], respectivamente). En cuanto al cáncer de cardias, solo la seropositividad frente a HP305 y Cag $\delta$  se asoció, de forma marginalmente significativa, con un riesgo menor de dicho tumor (OR=0,56 [IC 95%: 0,32-1,00] y OR=0,56 [IC 95%: 0,31-1,01], respectivamente).

En el análisis de componentes principales, teniendo en cuenta los valores propios (*eigenvalues*) obtenidos y la interpretabilidad clínico-epidemiológica se seleccionaron dos componentes o patrones de reactividad de anticuerpos frente a las distintas proteínas de *H. pylori* (Figura 6).

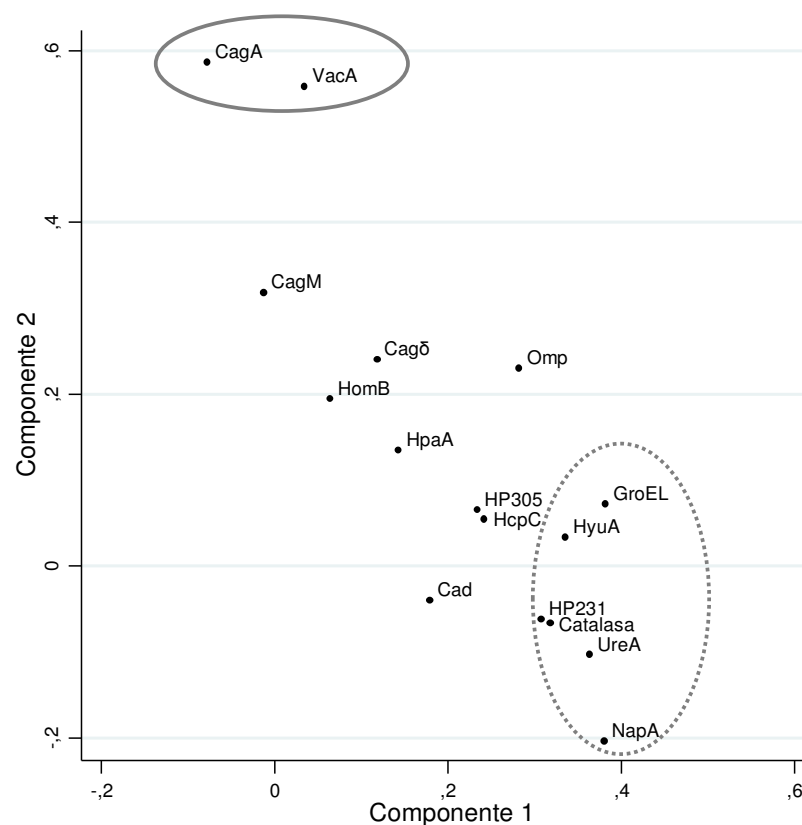


Figura 6. Pesos asignados a la reactividad de anticuerpos frente a las proteínas de *H. pylori* estudiadas, en cada uno de los componentes extraídos del análisis de componentes principales. El círculo punteado agrupa las proteínas más representativas del componente 1 y el de línea continua las más representativas del componente 2.

El componente 1 se caracterizaba por un nivel alta de serorreactividad frente a GroEL, NapA, UreA, HyuA, Catalasa y HP231 y el componente 2 por reactividad elevada de anticuerpos frente a CagA y VacA.

Al analizar su relación con el cáncer gástrico no-cardias, el primer componente, correspondería a un “patrón no virulento”, asociado con un 60% menos riesgo de cáncer gástrico no-cardias al comparar el cuartil superior de serorreactividad con el inferior, mientras que el segundo componente correspondería a un “patrón virulento”, asociado con un riesgo tres veces mayor de dicho tumor en la comparación del cuartil superior con el cuartil inferior (Tabla 3).

Tabla 3. Razones de odds (OR) de cáncer gástrico no-cardias entre los sujetos seropositivos frente a *H. pylori*, en función de la puntuación en cada uno de los dos patrones de reactividad de anticuerpos obtenidos en el análisis de componentes principales.

		Controles N (%)	CG No-cardias N (%)	OR (IC 95%)	Valor p
<b>Componente 1</b>	<b>C1</b>	457 (25%)	74 (39%)	Referencia	
	<b>C2</b>	459 (25%)	51 (27%)	0,62 (0,42-0,92)	0,019
	<b>C3</b>	458 (25%)	35 (18%)	0,41 (0,26-0,64)	<0,001
	<b>C4</b>	457 (25%)	31 (16%)	0,40 (0,25-0,63)	<0,001
<b>Componente 2</b>	<b>C1</b>	458 (25%)	23 (12%)	Referencia	
	<b>C2</b>	457 (25%)	36 (19%)	1,45 (0,84-2,51)	0,181
	<b>C3</b>	459 (25%)	65 (34%)	2,51 (1,52-4,15)	<0,001
	<b>C4</b>	457 (25%)	67 (35%)	3,03 (1,83-5,02)	<0,001

OR estimadas mediante modelos mixtos de regresión logística ajustados por edad, sexo, nivel de estudios, antecedentes familiares de cáncer gástrico, hábito tabáquico, provincia (término de efectos aleatorios) y por la puntuación en cada uno de los componentes. CG: cáncer gástrico. C1: cuartil inferior; C2: segundo cuartil; C3: tercer cuartil; C4: cuartil superior.

## Estudio 2. Reactividad de anticuerpos frente a *Helicobacter pylori* y riesgo de cáncer colorrectal en un estudio de casos y controles en España

La seropositividad frente a *H. pylori* (seropositividad frente a cuatro o más de las proteínas bacterianas analizadas) fue del 88% (IC 95%: 86-89) en los controles y del 90% (IC 95%: 88-91) en los casos de cáncer colorrectal. Tras ajustar por potenciales factores de confusión, la OR estimada bajo ninguno de los tres modelos descritos en el apartado anterior (Metodología general y presentación de los trabajos compendiados) reflejó una asociación estadísticamente significativa entre la seropositividad frente a *H. pylori* y el cáncer colorrectal (Tabla 4).

Tabla 4. Asociación entre el cáncer colorrectal y la seropositividad frente a *H. pylori*.

	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3	
	OR (IC95%)	Valor p	OR (IC95%)	Valor p	OR (IC95%)	Valor p
Colorrectal <sup>a</sup>	1,03 (0,83-1,29)	0,775	0,91 (0,71-1,16)	0,434	0,87 (0,67-1,12)	0,276
Colon derecho <sup>b</sup>	1,33 (0,90-1,96)	0,150	1,14 (0,74-1,73)	0,556	1,04 (0,67-1,62)	0,856
Colon izquierdo <sup>b</sup>	0,84 (0,62-1,13)	0,244	0,72 (0,52-1,01)	0,059	0,67 (0,47-0,96)	0,031
Recto <sup>b</sup>	1,05 (0,77-1,44)	0,761	0,95 (0,68-1,34)	0,784	0,95 (0,66-1,36)	0,768
<i>p</i> -het		0,118		0,168		0,177

<sup>a</sup> OR estimada mediante modelos mixtos de regresión logística multinivel. <sup>b</sup> OR estimadas mediante modelos mixtos de regresión logística multinomial.

La provincia se incluyó como término de efectos aleatorios en todos los modelos. Modelo 1: ajustado por edad, sexo y nivel de estudios. Modelo 2: ajustado además por hábito tabáquico, índice de masa corporal y antecedentes familiares de cáncer colorrectal. Análisis basado en los 2.138 controles, 1.160 casos de cáncer colorrectal, 299 de cáncer de colon derecho, 394 de colon izquierdo y 450 de recto que tenían información completa para todas las covariables. Modelo 3: ajustado además por ingesta total de energía, consumo de alcohol, ingesta de verduras y de carnes rojas y procesadas. En este análisis se incluyeron los 1.914 controles, 1.031 casos de cáncer colorrectal, 265 de cáncer de colon derecho, 342 de colon izquierdo y 409 de recto que tenían información completa para todas las covariables. P-het: valor p de la prueba de heterogeneidad entre las tres localizaciones tumorales.

Entre los participantes clasificados como *H. pylori* positivos, la seropositividad frente a las proteínas GroEL y NapA se asoció con un riesgo mayor de cáncer colorrectal, aunque de forma no estadísticamente significativa (Figura 7). La seropositividad frente a los factores de virulencia de *H. pylori* más ampliamente reconocidos, CagA y VacA, no se asoció con un riesgo mayor de cáncer colorrectal. En cambio, la seropositividad frente a HP305, HpaA y Cagδ se asoció con un riesgo menor de cáncer colorrectal (OR=0,85 [IC 95%: 0,74-0,99], OR=0,83 [IC 95%: 0,71-0,97] y OR=0,79 [IC 95%: 0,68-0,91], respectivamente). Al ajustar simultáneamente por el estatus serológico frente a las proteínas asociadas con un valor  $p < 0,10$  con el riesgo de cáncer en el análisis individual, Cagδ fue la única que mantuvo su asociación con el cáncer colorrectal (OR=0,81 [IC95%: 0,70-0,94]).

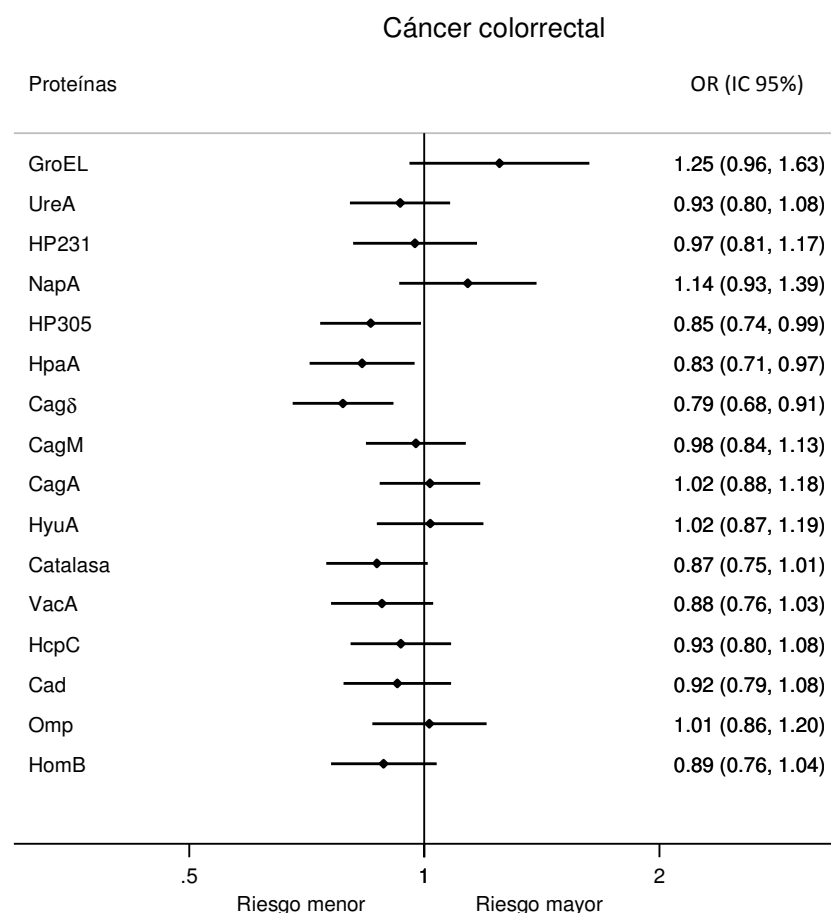


Figura 7. Asociación entre la seropositividad frente a cada proteína de *H. pylori* y el riesgo de cáncer colorrectal entre los participantes seropositivos a *H. pylori*. OR ajustadas por edad, sexo, nivel de estudios, antecedentes familiares de cáncer colorrectal y provincia (término de efectos aleatorios).

La exploración de la relación dosis-respuesta entre el nivel de serorreactividad y el riesgo de cáncer colorrectal mostró un incremento del 8% en el riesgo por cada aumento de un tercil de serorreactividad frente a GroEL, y un descenso del 11% y del 8% por cada tercil de aumento frente a HP305 y Cagδ, respectivamente.

El número de proteínas frente a las que la serología era positiva se asoció inversamente con el riesgo de cáncer colorrectal, con un descenso de un 3% en dicho riesgo por cada seropositividad frente a una proteína.

Los resultados del análisis estratificado por edad y sexo sugieren un efecto diferente de la seropositividad frente a *H. pylori* en el riesgo de cáncer colorrectal (Tabla 5). En mujeres mayores de 64 años ésta se asoció con un riesgo mayor de cáncer, mientras que en hombres del mismo grupo de edad y en mujeres más jóvenes no se observó asociación y en hombres menores de 65 años se asoció con un riesgo menor (valor p de la interacción: 0,005).



Tabla 5. Asociación entre la seropositividad frente a *H. pylori*\* y el riesgo de cáncer colorrectal por grupos de edad y sexo.

Edad	Hombres				Mujeres			
	Controles	Casos de	OR	IC 95%	Controles	Casos de	OR	IC 95%
	HP+ N (%)	CCR HP+ N (%)			HP+ N (%)	CCR HP+ N (%)		
<65	432/477	304/352	0,61	0,39-0,97	577/711	213/252	0,95	0,61-1,49
	(90,6%)	(86,4%)			(81,2%)	(84,5%)		
≥65	721/781	533/576	1,18	0,77-1,82	439/507	266/287	1,74	0,99-3,08
	(92,3%)	(92,5%)			(86,6%)	(92,7%)		

HP+: *H. pylori* seropositivo. CCR: cáncer colorrectal. OR estimadas mediante modelos mixtos de regresión logística multinivel ajustadas por edad, sexo, nivel de estudios, antecedentes familiares de cáncer colorrectal y hábito tabáquico; provincia de residencia incluida como término de efectos aleatorios. \* Positividad frente a cuatro o más proteínas de *H. pylori*.

En el análisis del estatus serológico frente a las proteínas individuales, la interacción con la edad y el sexo fue estadísticamente significativa para GroEL, HP231, HpaA y HomB (Figura 8).

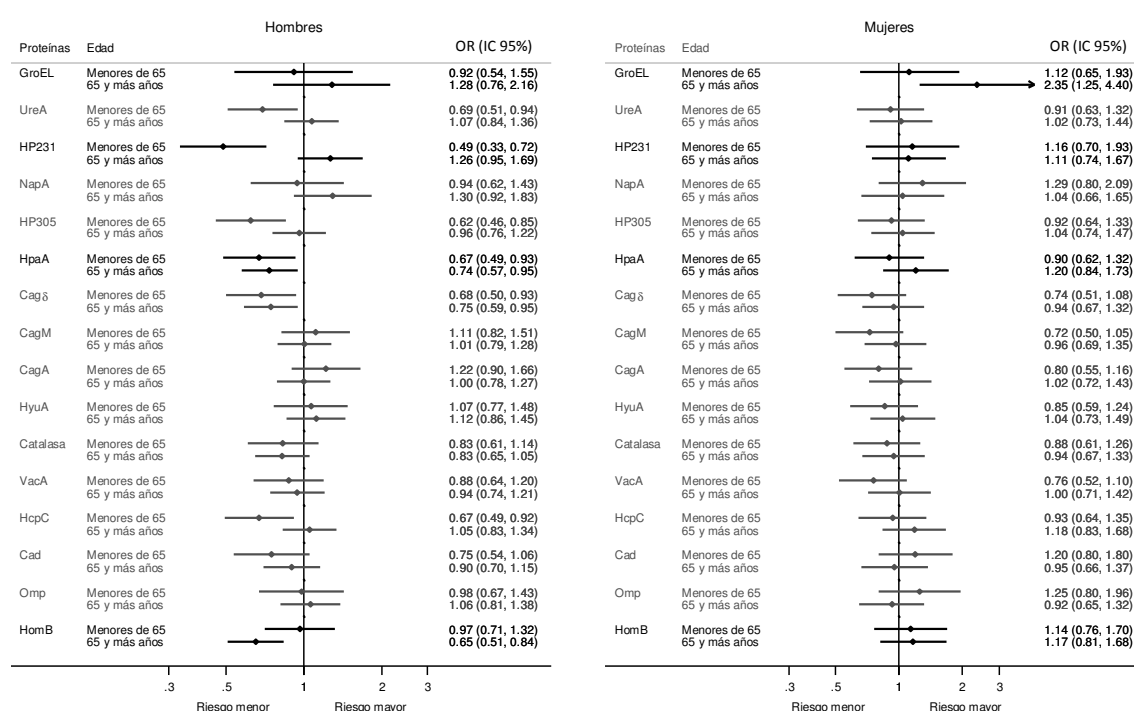


Figura 8. Asociación entre la seropositividad frente a cada proteína de *H. pylori* estudiada y el riesgo de cáncer colorrectal, por grupos de edad y sexo. OR ajustadas por edad, sexo, nivel de estudios, antecedentes familiares de cáncer colorrectal y hábito tabáquico; provincia de residencia incluida como término de efectos aleatorios

Por localización tumoral, en el colon izquierdo la seropositividad frente a *H. pylori* se asoció con un riesgo menor de cáncer en los tres modelos analizados (Tabla 4), aunque de forma no estadísticamente significativa excepto en el modelo 3 ( $p=0,031$ ). Tampoco fue estadísticamente significativa la prueba de heterogeneidad entre las tres localizaciones. En el análisis por

proteínas individuales no se observaron diferencias sustanciales en la asociación entre la seropositividad y el riesgo de cáncer en función de la localización del tumor (Figura 9). La prueba de heterogeneidad solo fue estadísticamente significativa para Cag $\delta$ . La seropositividad frente a Cag $\delta$  se asoció con un 26% y un 32% menor riesgo de cáncer de colon derecho e izquierdo, respectivamente, mientras que la asociación con el cáncer de recto no fue estadísticamente significativa (OR=0,94 [IC 95%: 0,76-1,15]).

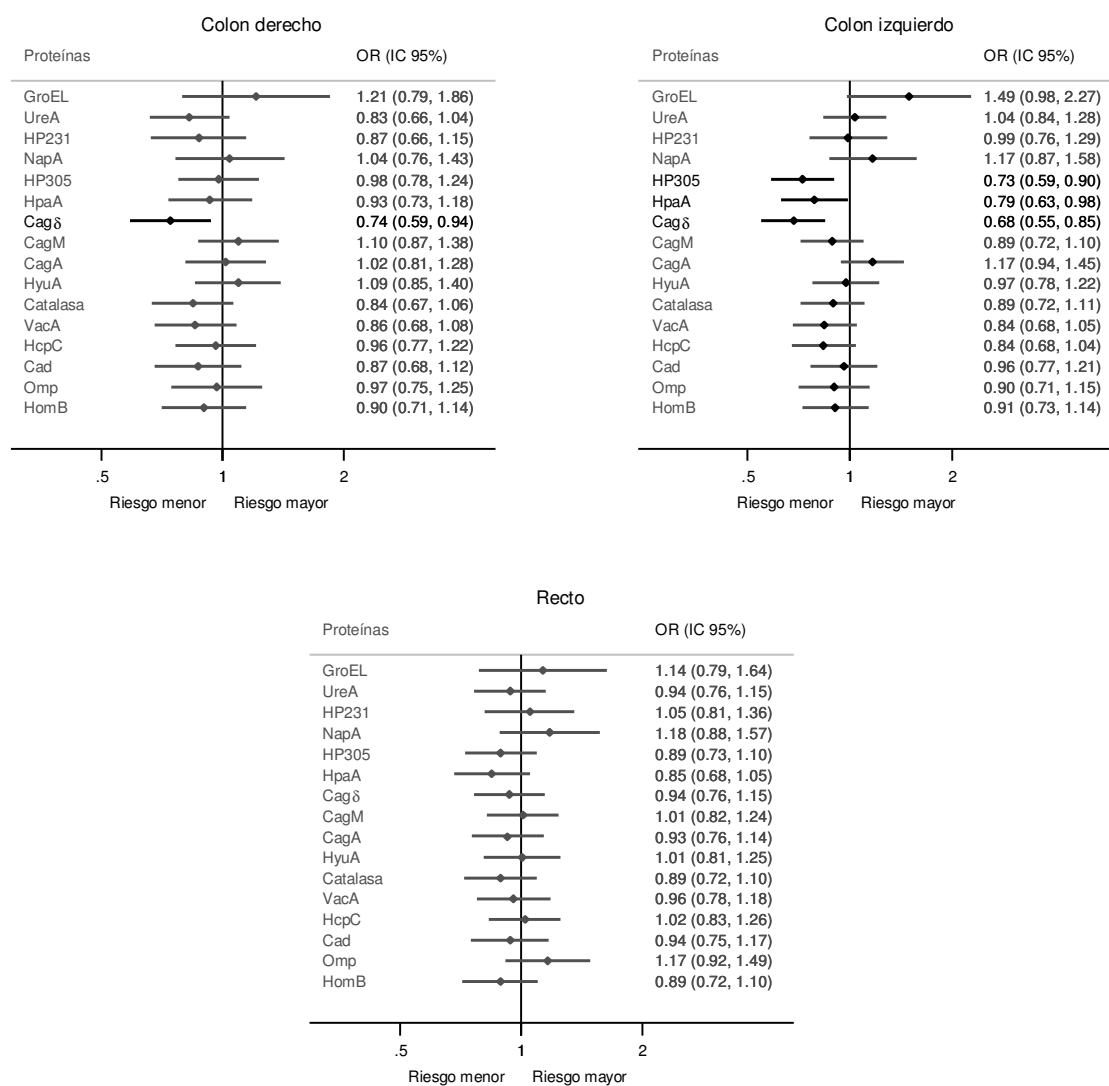


Figura 9. Asociación entre la seropositividad frente a cada proteína de *H. pylori* y el riesgo de cáncer de colon derecho, colon izquierdo y recto entre los participantes seropositivos a *H. pylori*. OR ajustadas por edad, sexo, nivel de estudios, antecedentes familiares de cáncer colorrectal y provincia (término de efectos aleatorios).

### Estudio 3. Reactividad de anticuerpos frente a proteínas de *Helicobacter pylori* en una muestra de población adulta en España en 2008-2013

La seroprevalencia global de *H. pylori* observada fue mayor en los grupos de edad más avanzada, tanto en hombres como en mujeres. En todos los grupos de edad estudiados, la seroprevalencia fue menor en mujeres que en hombres, aunque la diferencia solo resultó estadísticamente significativa para las edades comprendidas entre 55 y 74 años (84% frente a 92%,  $p < 0,001$ ).

Entre los participantes *H. pylori* positivos, las proteínas con el mayor porcentaje de seropositividad fueron GroEL (81%), NapA (74%), HP231 (72%) y Omp (66%). La seropositividad frente a la mayoría de las proteínas aumentaba o se mantenía estable con la edad, destacando el aumento frente a CagA, GroEL y HyuA en mujeres (Figura 10). Las excepciones fueron HP231, HP305 y Omp, cuyo porcentaje de seropositividad era menor en los grupos de edad más avanzada en ambos sexos, y HcpC solo en mujeres.

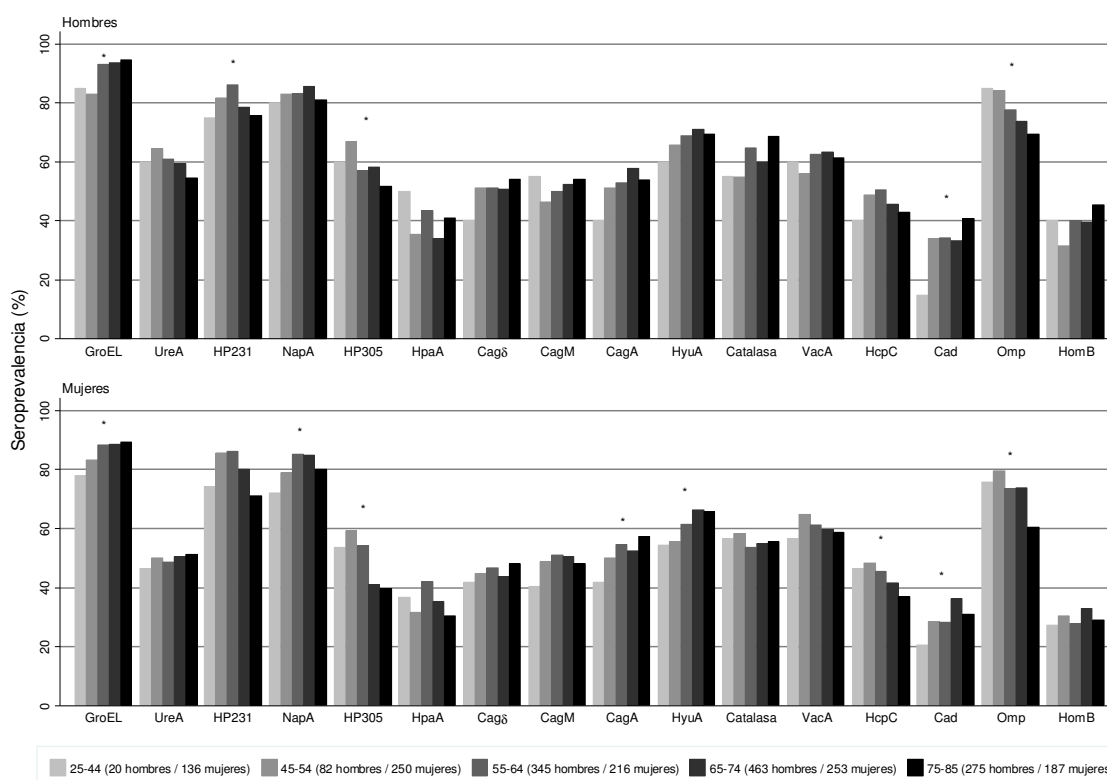


Figura 10. Porcentaje de seropositividad frente a cada proteína en personas *H. pylori* positivas, por grupo de edad y sexo. \*Tendencia estadísticamente significativa con la edad.

La diferencia entre regiones de nacimiento en el porcentaje de seroprevalencia y en el porcentaje de seropositividad frente a las distintas proteínas, por grupos de edad y sexo, fue en promedio del 20%. La comunidad autónoma de nacimiento explicaba un 7% de la variabilidad en la seroprevalencia, tras ajustar por edad y sexo.

El análisis edad-periodo-cohorte no reveló la presencia de un efecto cohorte claro para ninguna de las proteínas estudiadas (Figura 11).

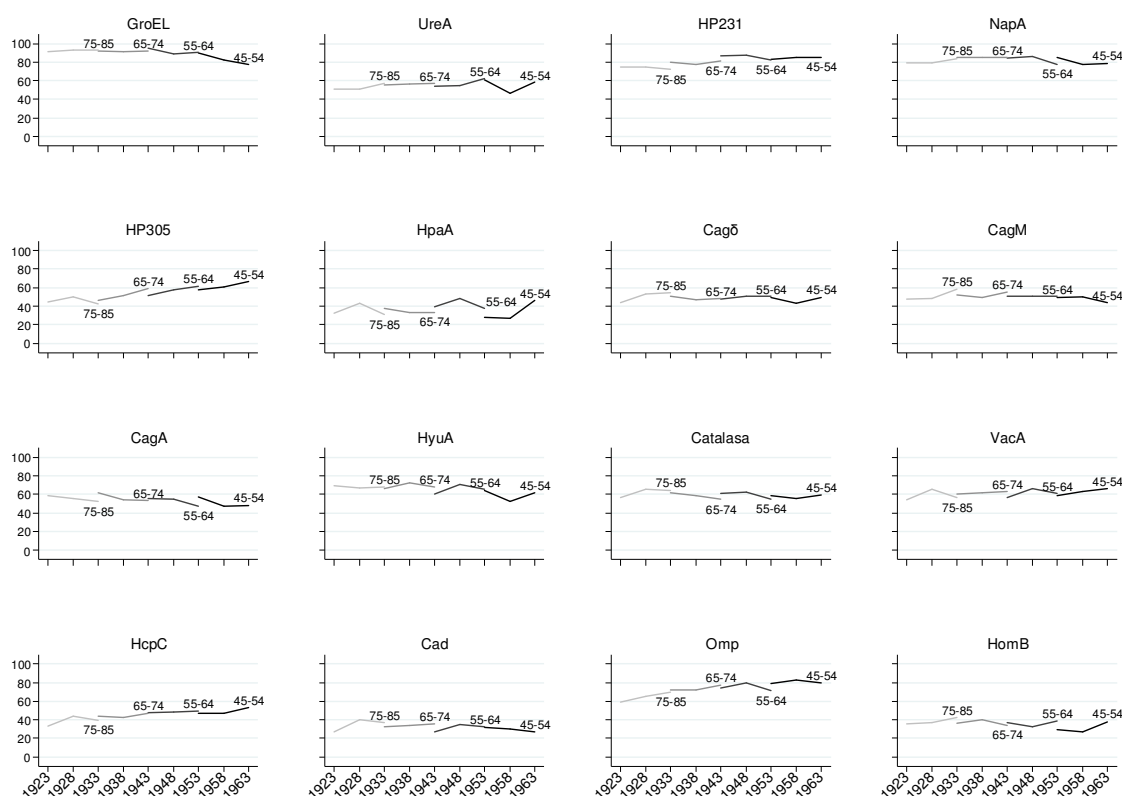


Figura 11. Gráficos edad-cohorte de la seropositividad frente a cada proteína de *H. pylori* en sujetos *H. pylori* positivos. El eje vertical representa el porcentaje de seropositividad y el eje horizontal el primer año de cada cohorte de nacimiento de 5 años.

En el análisis de la respuesta serológica como variable continua (serorreactividad) solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en función de la edad para la serorreactividad frente a las proteínas Ureasa (UreA), HpaA y CagA en mujeres, y HP231 y HP305 en hombres. En función del sexo solo fue estadísticamente significativa la diferencia en la serorreactividad frente a HyuA y Omp, siendo en ambos casos mayor en hombres que en mujeres (ajustado por edad).

## 6. DISCUSIÓN

---

## 6. Discusión

Las hipótesis planteadas al inicio de este trabajo han sido corroboradas parcialmente. Los resultados obtenidos parecen confirmar la existencia de diferencias en el riesgo de cáncer gástrico no-cardias en función del patrón de respuesta de anticuerpos frente a varias proteínas de *H. pylori* en personas seropositivas frente a dicha bacteria. En cambio, los resultados parecen no apoyar un papel de la respuesta serológica de anticuerpos frente a *H. pylori* como marcador de riesgo de cáncer colorrectal. En relación con la tercera de las hipótesis planteadas, los resultados apuntan a que en la población estudiada existen diferencias en la respuesta de anticuerpos frente a *H. pylori* en función de la edad, el sexo y el lugar de nacimiento.

A continuación se comentan algunos aspectos metodológicos a considerar a la hora de interpretar estos hallazgos, se discuten los resultados en el contexto del conocimiento científico actual y se exponen posibles implicaciones para la salud pública y la investigación.

### 6.1. Aspectos metodológicos

A la hora de interpretar los resultados obtenidos en cualquier estudio de investigación es necesario tener en cuenta las limitaciones y las fortalezas de los métodos empleados. En el caso de los trabajos incluidos en esta tesis, entre las limitaciones cabe destacar la dificultad derivada de su diseño como estudio de casos y controles, que impide conocer la secuencia temporal entre la exposición, en este caso la infección por *H. pylori*, y la enfermedad, el cáncer gástrico y el colorrectal. A pesar de que los casos se reclutaron de forma prospectiva, y de que se estableció como uno de los criterios de inclusión el ser casos incidentes, en el momento de analizar el estatus serológico frente a *H. pylori*, la enfermedad ya estaba presente, y por tanto podría haber modificado dicho estatus. Esta situación podría haber tenido lugar, teóricamente, en los casos en los que el tumor se hubiera desarrollado a partir de la evolución de una gastritis crónica atrófica, dado que los cambios subsecuentes que tienen lugar en la mucosa gástrica puede ocasionar un aclaramiento de la infección, el cual puede conllevar una disminución de los niveles de anticuerpos frente a la bacteria. Esta disminución de anticuerpos puede ser diferente para distintas proteínas, en función de sus características y de su nivel de antigenicidad. En concreto, se ha observado que los niveles de anticuerpos frente a VacA y CagA se mantienen elevados durante más tiempo que los de otras proteínas en etapas avanzadas de la evolución de la afectación de la mucosa gástrica (127) o tras el tratamiento de erradicación de la infección (128).

Además del aclaramiento de la infección secundaria a los cambios fisiopatológicos que tienen lugar en la mucosa gástrica durante la evolución de la atrofia gástrica y su progresión a metaplasia intestinal, displasia y finalmente adenocarcinoma invasivo, el tratamiento del cáncer también podría afectar al sistema inmunológico y modificar los niveles de anticuerpos. Por este motivo fueron realizados análisis de sensibilidad en el estudio del riesgo de cáncer de estómago (estudio 1), estimando el efecto estratificado por estadio tumoral (localizado o avanzado) y por haber recibido o no algún tipo de tratamiento para el tumor antes de la extracción de la muestra de sangre para el análisis serológico. Estos análisis no mostraron diferencias en función del estadio tumoral, aunque sí una OR menor en el subgrupo que había recibido tratamiento para el cáncer gástrico. Esto iría en consonancia con la hipótesis de una pérdida de anticuerpos causada por el tratamiento, que estaría dando lugar a una infraestimación de la asociación entre la seroprevalencia de infección y el riesgo de cáncer gástrico, y podría explicar algunas de las asociaciones inversas encontradas con la seropositividad frente proteínas individuales.

Otra limitación del estudio es la medición de la infección de forma indirecta, mediante la respuesta de anticuerpos, que por lo tanto no permite diferenciar entre infección activa e infección pasada. Sin embargo, el carácter cuantitativo de la serología múltiple para *H. pylori* utilizada podría aportar una diferenciación de forma indirecta entre infección presente, que tendría, potencialmente, niveles más altos de serorrespuesta, e infección pasada, con niveles más bajos por pérdida del estímulo antigénico.

Respecto a la técnica de laboratorio empleada, hay que señalar como limitación que no ha sido validada en nuestra población, por lo que no conocemos sus características de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, sí que ha sido validada en una muestra de la población alemana. En esa validación el criterio de cuatro o más proteínas seropositivas como umbral para clasificar como *H. pylori* positiva una muestra presentó una sensibilidad del 89% y una especificidad del 82%, en comparación con la técnica de ELISA y confirmación por *Western-blot* (86).

La alta seroprevalencia global de infección en la muestra de población estudiada, así como el elevado porcentaje de seropositividad frente a varias de las proteínas, principalmente GroEL, NapA y HP231, pueden haber conllevado una infraestimación de la magnitud de las OR (129).

A pesar de que los análisis estadísticos realizados incluyen como variables de ajuste los principales factores de riesgo conocidos, tanto para el cáncer gástrico como para el colorrectal, no podemos descartar la presencia de confusión residual en las estimaciones, bien por un ajuste insuficiente por falta de precisión en la medición de las variables utilizadas, bien por la ausencia de información acerca de potenciales factores de confusión adicionales. Así, cabe destacar la ausencia de

información acerca de la presencia de gastritis crónica atrófica o de haber seguido o no un tratamiento erradicador de la infección por *H. pylori*. Por otro lado, la información sobre el índice de masa corporal y sobre la dieta faltaba en un porcentaje no despreciable de la muestra, lo cual podría introducir un sesgo de selección al restringir el análisis a los casos y controles con dicha información. Por ello, en el análisis principal sobre la asociación entre la respuesta de anticuerpos frente a *H. pylori* y el cáncer colorrectal no se incluyeron estas variables, aunque sí se incluyeron en los análisis de sensibilidad realizados, cuyos resultados sugerían que el impacto de este posible sesgo no sería muy importante.

Otra limitación, que afectaría principalmente al estudio 3, tiene que ver con la representatividad de la muestra con respecto a la población general. La metodología empleada en la selección de los controles, apareados por frecuencia de edad y sexo con respecto a los casos de cada provincia, hace que los controles seleccionados no sean directamente representativos de la población de dichas provincias. Además, las tasas de respuesta, aunque dentro de lo habitual en este tipo de estudios que incluyen la recogida de muestras biológicas, es relativamente baja, por lo que no podemos descartar el posible impacto de un sesgo de selección.

También supone un punto débil del estudio 3 el corto periodo de reclutamiento de los participantes, que limita la disponibilidad de datos para poder realizar un análisis edad-periodo-cohorte.

Por último, a pesar del alto número de participantes, la potencia del estudio es limitada para analizar determinados subgrupos, principalmente grupos de edad más jóvenes, mujeres o determinadas localizaciones tumorales como el cardias o el recto, en las que el número de participantes fue menor.

Entre las fortalezas del trabajo cabe destacar que en el diseño del estudio de casos y controles se utilizaron diversas estrategias que han sido descritas como apropiadas para paliar las limitaciones inherentes a este tipo de diseño. En primer lugar, los casos que se reclutaron fueron casos incidentes, y para su inclusión definitiva debían tener la confirmación histológica del diagnóstico. En segundo lugar, los controles fueron de base poblacional, lo cual reduce el potencial riesgo de confusión atribuido a la selección de otro tipo de controles, como los hospitalarios. Además, el número de participantes es alto, lo cual da mayor robustez a los resultados obtenidos.

Otra de las fortalezas del estudio es la utilización de la serología múltiple, que además de permitir el análisis de la respuesta de anticuerpos frente a varias proteínas en un mismo ensayo, tiene una alta sensibilidad (86), lo cual contribuiría a paliar el impacto de una posible inmunodepresión



asociada al cáncer o a su tratamiento en la estimación de la asociación entre la respuesta de anticuerpos y el cáncer.

Por último, cabe destacar la exhaustividad de la recogida de datos epidemiológicos, que ha permitido disponer de información acerca de los principales factores de riesgo conocidos de cáncer gástrico y colorrectal, y poder de este modo ajustar los análisis estadísticos por dichos factores y reducir el riesgo de confusión en las asociaciones estudiadas.

## 6.2. Interpretación de los resultados

El **Estudio 1** ha permitido identificar dos **patrones de respuesta de anticuerpos** frente a distintas proteínas de *H. pylori*, y una relación entre estos patrones y el riesgo de cáncer gástrico no-cardias. En primer lugar, se ha identificado un patrón caracterizado por reactividad de anticuerpos elevada frente a CagA y VacA, que se asoció con un riesgo mayor de dicho tumor. El segundo patrón se caracterizó por reactividad elevada frente varias proteínas bacterianas, principalmente UreA, HP231, NapA, HyuA y Catalasa, y se asoció con un riesgo menor de cáncer gástrico no-cardias. Anteriormente, un estudio llevado a cabo en Suecia encontró también dos patrones de respuesta serológica frente a proteínas de *H. pylori*, uno dominado por CagA, con pesos altos para CagA, VacA y Omp, y otro “no-CagA”, caracterizado por pesos altos para NapA y Catalasa, aunque en dicho estudio ambos patrones se asociaron con un riesgo mayor de cáncer gástrico no-cardias (120).

En el análisis de la respuesta serológica frente a las distintas proteínas de *H. pylori*, la **seropositividad frente a Cagδ** se asoció de forma independiente con un riesgo menor de cáncer gástrico no-cardias y también con un riesgo menor de cáncer colorrectal en el Estudio 2. En ambos casos se observó una relación dosis-respuesta, lo cual da mayor peso a un posible papel como marcador de menor riesgo de estos tumores. Sin embargo, dado que este resultado no se ha observado de forma consistente en otros estudios, es difícil valorar su relevancia y plantea la necesidad de evaluar su reproducibilidad en otras poblaciones.

Por su parte, la **seropositividad frente a la proteína CagA** se asoció con un riesgo mayor de cáncer gástrico no-cardias, observándose también en este caso una relación dosis-respuesta. CagA es una citotoxina de *H. pylori*, reconocida como factor de virulencia y carcinogénico, por lo que este resultado es coherente con la evidencia disponible. Además, el haber encontrado esta asociación dentro de la muestra de participantes clasificados como *H. pylori* positivos contribuye a resaltar el papel que la seropositividad frente a esta proteína puede tener como marcador de riesgo

de cáncer gástrico, adicional al de la propia infección. Cabe señalar que este papel como marcador de riesgo puede no ser extrapolable a poblaciones de otras regiones debido a la existencia de diferencias tanto en la prevalencia de cepas CagA-positivas como en el tipo de cepas. Se ha observado que la actividad citotóxica de CagA depende del número y de las secuencias de los motivos Glu-Prol-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) presentes en el sitio de fosforilación de residuos de tirosina en la región C-terminal de la proteína, y que estas características varían entre unas zonas geográficas y otras. Según los aminoácidos presentes entre las secuencias EPIYA se han identificado cuatro tipos: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C y EPIYA-D. En función del número y el tipo de estos motivos, las cepas de *H. pylori* se han agrupado en dos tipos: el tipo oriental (presente predominantemente en el este asiático), caracterizado por motivos EPIYA-A, EPIYA-B y habitualmente un único EPIYA-D, y el tipo occidental, caracterizado por motivos EPIYA-A, EPIYA-B y uno o varios EPIYA-C (130).

Otros estudios también han descrito asociaciones inversas entre la seropositividad frente a algunas proteínas de *H. pylori* y el riesgo de cáncer gástrico (122,123), aunque este no es un hallazgo consistente entre los estudios, y algunos trabajos han encontrado mayor riesgo de cáncer gástrico asociado a la seropositividad frente a proteínas que se han asociado con un menor riesgo en otros trabajos (119–121). Algunas diferencias metodológicas entre los estudios citados podrían contribuir a explicar las diferencias en sus resultados, especialmente la no inclusión en algunos de ellos de participantes con gastritis crónica atrófica, así como las diferencias en la seroprevalencia de la infección por *H. pylori* y en la seropositividad frente a las distintas proteínas, que puede hacer que las OR estimadas en muestras con prevalencias más altas sean más bajas que en muestras con prevalencias inferiores (129,131).

Con respecto a la asociación con el **cáncer de cardias**, los resultados del estudio 1 son consistentes con los de investigaciones previas, que no han encontrado un mayor riesgo de cáncer en esta localización asociado a la infección por *H. pylori* (132,133). Por lo tanto este resultado contribuye a fortalecer la evidencia disponible, que es más limitada que para los tumores no-cardias debido, entre otros factores, a que el número de casos de cáncer de cardias incluidos en la mayor parte de los estudios es generalmente inferior al de los de no-cardias.

Los resultados del **Estudio 2** sugieren que la infección por *H. pylori* no representa un factor de riesgo de cáncer colorrectal. Tampoco la seropositividad frente a ninguna de las proteínas de *H. pylori* estudiadas se asoció con un riesgo mayor de este tumor. Estos resultados contrastan con los de varios metanálisis publicados (108–115), que aunque débil, encuentran una asociación positiva entre la infección por *H. pylori* y el riesgo de cáncer colorrectal. En cambio, nuestros resultados son consistentes con los de dos estudios de casos y controles anidados publicados recientemente y

que utilizan también la serología múltiple para *H. pylori*, los cuales no han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de cáncer de colon ni de recto asociadas a la infección por este microorganismo (124,125).

En cambio, tal y como se ha mencionado anteriormente en este mismo apartado de discusión, la seropositividad frente a Cag $\delta$  se asoció, de manera independiente al estatus serológico frente a otras proteínas de *H. pylori*, con un riesgo menor de cáncer colorrectal, principalmente de cáncer de colon. El único estudio identificado que ha analizado la serorrespuesta frente a Cag $\delta$  en relación con el riesgo de cáncer colorrectal no ha encontrado una asociación entre ambos (124). En ese estudio, en cambio, encontraron una asociación positiva estadísticamente significativa con la seropositividad frente a varias proteínas (VacA, HP231, HP305, NapA y HcpC). Cabe señalar que dicho estudio fue realizado en población norteamericana, predominantemente afroamericana, por lo que los resultados no son fácilmente comparables.

La seropositividad frente a CagA, el factor de virulencia más establecido de *H. pylori*, no se asoció con un riesgo mayor de cáncer colorrectal. Este hallazgo sería consistente con la hipótesis de que el mecanismo de acción de esta citotoxina se circunscribe a un efecto local, en los lugares donde la bacteria se encuentra en contacto con las células epiteliales, como ocurre en la mucosa gástrica, lo cual posibilita la introducción de la proteína CagA en el interior de la célula mediante el sistema secretor tipo 4 presente en la membrana bacteriana.

La única proteína cuya seropositividad se asoció de forma estadísticamente significativa con un riesgo mayor de cáncer colorrectal fue GroEL. Blase *et al.* encontraron una asociación similar en una población norteamericana predominantemente caucásica (125), mientras que Epplein *et al.* no encontraron asociación entre la seropositividad a GroEL y el riesgo de cáncer colorrectal (124). GroEL es una proteína del grupo de las chaperonas, altamente conservada, por lo que la medición de los anticuerpos frente a ella está sujeta a una mayor probabilidad de reacciones cruzadas. Por lo tanto, la observación de esta asociación puede no ser específica de *H. pylori*, y podría estar reflejando una asociación con infecciones por otras bacterias, como *E. coli*, que expresa una proteína semejante.

Los resultados del análisis de una posible **interacción entre la edad y el sexo** en la asociación de la seropositividad frente a *H. pylori* con el cáncer colorrectal sugieren que dicha seropositividad se asocia con un riesgo mayor de cáncer colorrectal en mujeres mayores de 64 años, mientras que en hombres menores de 65 años se asocia con un riesgo menor, y en mujeres menores de 65 años y hombres mayores de esa edad no existiría asociación. Posibles diferencias en la exposición a factores de riesgo de cáncer colorrectal entre hombres y mujeres y en función de la edad, como en

el tipo de dieta o el índice de masa corporal, podrían estar en la base de estas diferencias. Sin embargo, no se puede descartar que este sea un hallazgo casual, por lo que debe tomarse con cautela. En su caso, podría servir para estimular la investigación sobre las posibles causas de estas diferencias o al menos para promover que en estudios futuros se presenten los resultados estratificados por edad y sexo.

En cuanto a los resultados en función del **lugar de asentamiento del tumor**, en general estos fueron similares para las tres localizaciones estudiadas (colon derecho, colon izquierdo o recto). Aunque algunos de los estudios publicados han encontrado diferencias según la localización del tumor, no hay un acuerdo claro entre ellos en cuanto a la dirección de las mismas. En el análisis de sensibilidad del metanálisis publicado por Wu *et al.* no se encontraron diferencias en el efecto estimado para la infección por *H. pylori* en el riesgo de cáncer de colon o de recto (113).

Los resultados del **Estudio 3** muestran la presencia, en población general adulta en España, de cierta variabilidad en función de la edad, el sexo y la comunidad autónoma de nacimiento tanto en la seroprevalencia global de infección por *H. pylori* como en el porcentaje de seropositividad frente a las distintas proteínas estudiadas.

La seroprevalencia fue ligeramente más alta en **hombres** que en **mujeres** en todos los grupos de edad estudiados, tal como se ha observado en otros estudios (53). En la muestra estudiada en este trabajo, los hombres refirieron un nivel socioeconómico más bajo en su hogar de nacimiento que las mujeres, lo cual podría explicar, al menos parcialmente, las diferencias observadas por sexo, dado que un nivel socioeconómico bajo en el entorno familiar durante la infancia es uno de los principales factores de riesgo descritos para la infección por *H. pylori*. Entre las personas clasificadas como *H. pylori* positivas (seropositivas frente a cuatro o más proteínas), las mujeres presentaron, con respecto a los hombres, porcentajes de seropositividad inferiores frente a todas las proteínas estudiadas, tras ajustar por edad. En el caso de los factores de virulencia CagA y VacA, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los resultados de un estudio de seroprevalencia llevado a cabo en Alemania, que utilizó la serología múltiple para *H. pylori* para analizar las mismas proteínas (excepto HomB), muestran también un porcentaje de seropositividad más bajo en mujeres que en hombres para la mayoría de las proteínas (134).

**Por grupos de edad**, la seroprevalencia de infección fue alta incluso en el grupo más joven (25-44 años), en el que fue superior al 70% tanto en hombres como en mujeres, y aumentó con la edad en ambos sexos, aunque en hombres a partir del grupo de edad de 55 a 64 años ya no se observó un incremento sino que se mantuvieron las cifras en un 92%. En el estudio antes mencionado realizado en Alemania también se observó un aumento en el porcentaje de seropositividad con la edad. Los

autores estimaron que existía un incremento en la seroprevalencia global de infección por cada 10 años de un 11% en mujeres y un 13% en hombres (134).

Aunque limitado por el corto periodo de reclutamiento, el **análisis de edad-periodo-cohorte** realizado apunta hacia un impacto mayor de la edad que de la cohorte de nacimiento en las diferencias por edad observadas, tanto en la seroprevalencia global de infección como en la seropositividad frente a la mayoría de las proteínas estudiadas individualmente. Las principales excepciones son, por un lado HP305 y Omp, que muestran una tendencia creciente con porcentajes de seropositividad mayores en cohortes más jóvenes, y por otro CagA, con porcentajes de seropositividad menores en cohortes más recientes.

Por último, con respecto a la **variabilidad entre regiones**, el rango de la seroprevalencia global de infección osciló entre un 77% en la región centro-norte (Navarra y País Vasco) y un 92% en la región noroeste (Asturias y Cantabria). Tras ajustar por la distribución por edad y sexo, la comunidad autónoma de nacimiento explicó un porcentaje pequeño pero no despreciable de variabilidad en la seroprevalencia global de infección. Estos resultados sugieren que los factores individuales como la edad y el sexo tendrían una influencia mayor que los factores ambientales en la frecuencia de infección por *H. pylori*, pero que los factores ambientales también tendrían su importancia. Además, dado que la división en comunidades autónomas es una división geopolítica, no es posible descartar que determinados factores ambientales cuya distribución no se corresponda con los límites de las comunidades autónomas y cuyo efecto por tanto no sería captado con los datos de este trabajo, tengan un impacto importante.

### 6.3. Implicaciones en salud pública

La alta seroprevalencia observada tanto de la infección por *H. pylori* en general como de la seropositividad frente a los principales factores de virulencia reconocidos de esta bacteria, CagA y VacA, pone de relieve la importancia de seguir investigando sobre la historia natural de la infección por *H. pylori*, los factores de riesgo de infección -tanto individuales como ambientales-, así como sobre posibles medidas preventivas que contribuyan a reducir el número de personas que adquieren la infección.

Mientras no se disponga de medidas de prevención primaria efectivas, es importante mantener el nivel de sospecha clínica de las enfermedades relacionadas con la infección crónica por *H. pylori*, como el cáncer gástrico y la úlcera péptica, que contribuya a obtener un diagnóstico lo más precoz posible y por lo tanto a mejorar la supervivencia de las personas afectadas.

Los patrones de respuesta de anticuerpos frente a *H. pylori* identificados en esta tesis podrían servir como marcador de riesgo de cáncer gástrico no-cardias y ayudar a personalizar las indicaciones para realizar el diagnóstico y el tratamiento de la infección por *H. pylori*. Para ello, antes sería necesario confirmar la reproducibilidad de los resultados en otras poblaciones, y validar su capacidad diagnóstica para, en su caso, valorar la posibilidad de hacer disponible la tecnología de la serología múltiple para *H. pylori* en la práctica clínica.

#### **6.4. Contribución al estado del conocimiento e investigaciones futuras**

Los resultados de esta tesis refuerzan el papel de los anticuerpos frente a los factores de virulencia de *H. pylori* CagA y VacA como marcadores importantes de riesgo de cáncer gástrico no-cardias. Además, se ha identificado un patrón de respuesta de anticuerpos, caracterizado por niveles altos de reactividad frente a diversas proteínas de *H. pylori*, que se ha asociado con un riesgo menor de este tumor en personas seropositivas frente a dicha bacteria. Aunque en otros estudios se han descrito asociaciones inversas con la seropositividad frente a determinadas proteínas de forma individual, hasta ahora no se había descrito un patrón conjunto que pudiera identificar a personas con un riesgo menor de cáncer gástrico no-cardias, las cuales podrían beneficiarse de un abordaje menos agresivo en el manejo de la infección.

Aun teniendo en cuenta que el nivel de evidencia aportado por los estudios de casos y controles no es muy alto, los resultados de esta tesis contribuyen al cuerpo de evidencia existente acerca de la posible asociación entre la infección por *H. pylori* y el cáncer de colon y de recto, en el sentido de que dicha asociación no parece estar presente o en caso de estarlo no sería de gran magnitud.

La descripción realizada de la seroprevalencia de infección por *H. pylori* en la población estudiada aporta información a nivel principalmente local, pero contribuye a su vez al conocimiento general de la epidemiología de esta infección, la cual se caracteriza por diferencias geográficas importantes.

Como es habitual con los resultados de investigación, algunos de los hallazgos encontrados en los trabajos compendiados requerirían ser confirmados en otras poblaciones antes de aceptarlos como definitivos y aplicarlos en la toma de decisiones en salud pública o en la priorización de la investigación. En este sentido, tanto el valor de la seropositividad frente a Cag $\delta$  como el de la puntuación en los patrones de anticuerpos como marcadores de un riesgo más bajo de cáncer

---

gástrico no-cardias en personas seropositivas frente a *H. pylori* debería ser evaluado en otras poblaciones de cara a comprobar su reproducibilidad.

Los resultados de esta tesis han dado lugar también a nuevas hipótesis de estudio, como el posible efecto diferencial de la seropositividad frente a *H. pylori* en el riesgo de cáncer colorrectal dependiendo de la edad y el sexo, o la posible asociación con el cáncer colorrectal de los patrones de serorreactividad encontrados para el cáncer gástrico.

Por último, cabe mencionar algunos aspectos de interés en el tema objeto de esta tesis y que no han sido abordados en la misma, como sería la interacción con factores genéticos y con exposiciones ambientales.

## **7. CONCLUSIONES**

---



## 7. Conclusiones

1. La seropositividad frente a *H. pylori* en una población residente en España, predominantemente caucásica, se asoció con un aumento del 90% en el riesgo de cáncer gástrico no-cardias.
2. En personas seropositivas frente a *H. pylori*, un patrón de respuesta de anticuerpos con niveles altos de reactividad frente a las proteínas CagA y VacA de *H. pylori* se asocia con un incremento del riesgo de cáncer gástrico no-cardias de hasta 3 veces para aquellas personas con una puntuación en el cuartil superior con respecto al cuartil inferior.
3. En personas seropositivas frente a *H. pylori*, un patrón de respuesta de anticuerpos con niveles altos de reactividad frente a varias proteínas de *H. pylori*, especialmente UreA, HP231, NapA, HyuA y Catalasa, se asocia con una reducción del riesgo de cáncer gástrico no-cardias de hasta un 60% en las personas con una puntuación en el cuartil superior con respecto a las del cuartil inferior.
4. La seropositividad frente a *H. pylori* en una población residente en España, predominantemente caucásica, no se asoció con un aumento de riesgo de cáncer gástrico localizado en cardias.
5. La seropositividad global frente a *H. pylori* y la seropositividad frente al factor de virulencia CagA no se asocian con un riesgo mayor de cáncer de colon ni de recto.
6. Podría existir un efecto diferente de la infección por *H. pylori* en el riesgo de cáncer colorrectal en función de la edad y el sexo, aunque este hallazgo requeriría confirmación adicional en otros estudios.
7. La seropositividad frente a la proteína Cag $\delta$  de *H. pylori* podría ser un marcador de menor riesgo tanto de cáncer gástrico como colorrectal. Si este resultado se confirmara en otras poblaciones, podría ser interesante realizar estudios encaminados a caracterizar el papel de esta proteína en la infección por *H. pylori*.
8. En la muestra estudiada de población adulta residente en distintas comunidades autónomas existe variabilidad en el perfil de anticuerpos frente a *H. pylori* en función de factores individuales como la edad y el sexo, y de factores ambientales como la región de nacimiento.
9. La escasa diferencia observada en el porcentaje de seropositividad frente a *H. pylori* en edades más jóvenes con respecto a las más avanzadas pone de manifiesto la importancia que mantiene hoy en día esta infección en la población estudiada y la necesidad de mantener la vigilancia de las enfermedades relacionadas con la infección, así como la investigación en sus factores de riesgo y medidas preventivas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

## 8. Bibliografía

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
2. OMS. Base de datos de mortalidad de la OMS [Internet]. [cited 2017 Oct 16]. Disponible en: [http://www.who.int/healthinfo/mortality\\_data/en/](http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/)
3. Gonzalo López-Abente, Olivier Núñez, Beatriz Pérez-Gómez, Nuria Aragonés, Marina Pollán. La situación del cáncer en España: Informe 2015. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2015 p. 1–151.
4. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII. Mortalidad por cáncer y otras causas en España. Año 2015 [Internet]. 2015 [citado el 14 de julio de 2017]. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-epidemiologia-ambiental-y-cancer/mortalidad-cancer-en-espana.shtml>
5. M. Ervik, F. Lam, J. Ferlay, L. Mery, I. Soerjomataram, F. Bray. *Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2016.
6. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374–403.
7. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease study. *JAMA Oncol*. 2017;3(4):524–48.
8. REDECAN Working Group, Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, *et al.* Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(7):799–825.
9. Aragonés N, Izarzugaza MI, Ramos M, Chirlaque MD, Almar E, Martínez C, *et al.* Trends in oesophago-gastric cancer incidence in Spain: Analysis by subsite and histology. *Ann Oncol*. 2010;21(Supplement 3):iii69–75.
10. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric Cancer: Descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(5):700–13.
11. Colquhoun A, Arnold M, Ferlay J, Goodman KJ, Forman D, Soerjomataram I. Global patterns of cardia and non-cardia gastric cancer incidence in 2012. *Gut*. 2015;64(12):1881–8.
12. Aragonés N, Goicoa T, Pollán M, Militino AF, Pérez-Gómez B, López-Abente G, *et al.* Spatio-temporal trends in gastric cancer mortality in Spain: 1975–2008. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(4):360–9.
13. Cancer and Environmental Epidemiology Unit. Interactive Epidemiological Information System (Ariadna) [Internet]. Madrid: Carlos III Institute of Health; 2015 [citado el 1 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://ariadna.cne.isciii.es/>
14. Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Ramis R, Vidal E, Lope V, *et al.* The striking geographical pattern of gastric cancer mortality in Spain: Environmental hypotheses revisited. *BMC Cancer*. 2009;9:316.
15. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X-S, *et al.* Global surveillance of cancer survival 1995–2009: Analysis of individual data for 25,676,887 patients

- from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015;385(9972):977–1010.
16. Glória L, Bossard N, Bouvier A-M, Mayer-da-Silva A, Faivre J, Miranda A. Trends in net survival from stomach cancer in six European Latin countries: Results from the SUDCAN population-based study. *Eur J Cancer Prev*. 2017;26:S32–9.
  17. Parkin DM, Boyd L, Walker LC. 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer*. 2011;105:S77–81.
  18. Coglianò VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, *et al*. Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(24):1827–39.
  19. World Cancer Research Fund International/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Report: Diet, nutrition, physical activity and stomach cancer [Internet]. 2016 [citado el 18 de julio de 2017] p. 1–59. Disponible en: [wcrf.org/stomach-cancer-2016](http://wcrf.org/stomach-cancer-2016).
  20. Fortunato L, Rushton L. Stomach cancer and occupational exposure to asbestos: A meta-analysis of occupational cohort studies. *Br J Cancer*. 2015;112(11):1805–15.
  21. Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, de Martel C. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*. 2015;136(2):487–90.
  22. Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Gastric cancer. *The Lancet*. 2016;388(10060):2654–64.
  23. Faivre J, Bossard N, Jooste V. Trends in net survival from colon cancer in six European Latin countries: Results from the SUDCAN population-based study. *Eur J Cancer Prev*. 2017;26:S40–7.
  24. Lepage C, Bossard N, Dejardin O, Carmona-Garcia MC, Manfredi S, Faivre J. Trends in net survival from rectal cancer in six European Latin countries: Results from the SUDCAN population-based study. *Eur J Cancer Prev*. 2017;26:S48–55.
  25. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490–502.
  26. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: A synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. 2016;4(9):e609–16.
  27. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum World Health Organ Int Agency Res Cancer. 2012;100(Pt B):1–441.
  28. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983;1(8336):1273–5.
  29. Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(6):441–52.
  30. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(4):720–41.
  31. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, *et al*. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2007;445(7130):915–8.
  32. Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: A systematic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci*. 2014;59(8):1698–709.
  33. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, *et al*. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2017;153(2):420–9.

34. Rodrigo Sáez L, Riestra Menéndez S, Fernández Rodríguez E, Fernández Velázquez MR, García Alonso S, Lauret Braña ME. Epidemiological study of the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the general population in Asturias, Spain. *Rev Esp Enfermedades Dig.* 1997;89(7):511–22.
35. Cilla G, Pérez-Trallero E, García-Bengoechea M, Marimón JM, Arenas JL. *Helicobacter pylori* infection: A seroepidemiological study in Gipuzkoa, Basque Country, Spain. *Eur J Epidemiol.* 1997;13(8):945–9.
36. Martín-de-Argila C, Boixeda D, Cantón R, Mir N, de Rafael L, Gisbert J, *et al.* *Helicobacter pylori* infection in a healthy population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996;8(12):1165–8.
37. Baena Díez JM, García Lareo M, Martí Fernández J, León Marín I, Muñoz Llama D, Teruel Gila J, *et al.* [Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in primary care: Sero-epidemiological study]. *Aten Primaria.* 2002;29(9):553–7.
38. Ràfols Crestani A, Solanas Saura P, Ramió Pujolràs G, Suelves Esteban N, Rodríguez González C, González Pastor C, *et al.* [Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in primary health care]. *Aten Primaria.* 2000;25(8):563–7.
39. Macenlle García R, Gayoso Diz P, Sueiro Benavides RA, Fernández Seara J. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the general adult population of the province of Ourense. *Rev Esp Enfermedades Dig.* 2006;98(4):241–8.
40. Sánchez Ceballos F, Taxonera Samsó C, García Alonso C, Alba López C, Sainz de Los Terreros Soler L, Díaz-Rubio M. [Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the healthy population of Madrid (Spain)]. *Rev Esp Enfermedades Dig.* 2007;99(9):497–501.
41. Navarro M, Calvet X, Font B, Sanfeliu I, Segura F. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the Vallès Occidental, Catalonia. *Clin Microbiol Infect.* 1999;5(11):704–6.
42. Castro-Fernández M, Vargas-Romero J, Hoyas E, Lamas E, Millán R, Romero-Gómez M. Relationship between *H. pylori* and hepatitis A virus infection. *Rev Esp Enfermedades Dig.* 2012;104(4):220–1.
43. Senra-Varela A, Lopez-Saez JB, Gomez-Biondi V. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in two Spanish regions with different incidence of gastric cancer. *Eur J Epidemiol.* 1998;14(5):491–4.
44. Burucoa C, Axon A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2017;22:e12403.
45. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *J Adv Res.* 2015;6(4):539–47.
46. Mitchell H, Katelaris P. Epidemiology, clinical impacts and current clinical management of *Helicobacter pylori* infection. *Med J Aust.* 2016;204(10):376–80.
47. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2014;19 Suppl 1:1–5.
48. Krueger WS, Hilborn ED, Converse RR, Wade TJ. Environmental risk factors associated with *Helicobacter pylori* seroprevalence in the United States: A cross-sectional analysis of NHANES data. *Epidemiol Infect.* 2015;143(12):2520–31.
49. Brown LM. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev.* 2000;22(2):283–97.
50. Lee YY, Ismail AW, Mustaffa N, Musa KI, Majid NA, Choo KE, *et al.* Sociocultural and dietary practices among Malay subjects in the north-eastern region of Peninsular Malaysia: A region of low prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2012;17(1):54–61.

51. Naja F, Kreiger N, Sullivan T. *Helicobacter pylori* infection in Ontario: Prevalence and risk factors. *Can J Gastroenterol*. 2007;21(8):501–6.
52. Russo A, Maconi G, Lombardo C, Settesoldi D, Ferrari D, Ravagnani F, *et al*. Human leukocyte antigen class II genes and *Helicobacter pylori* infection: Does genotype overwhelm environmental exposure? *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. 2003;19(9):708–15.
53. Ibrahim A, Morais S, Ferro A, Lunet N, Peleteiro B. Sex-differences in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in pediatric and adult populations: Systematic review and meta-analysis of 244 studies. *Dig Liver Dis*. 2017;49(7):742–9.
54. Liu S-Y, Han X-C, Sun J, Chen G-X, Zhou X-Y, Zhang G-X. Alcohol intake and *Helicobacter pylori* infection: A dose-response meta-analysis of observational studies. *Infect Dis*. 2016;48(4):303–9.
55. Eslami O, Shahraki M, Shahraki T, Ansari H. Association of *Helicobacter pylori* infection with metabolic parameters and dietary habits among medical undergraduate students in southeastern of Iran. *J Res Med Sci*. 2017;22(1):12.
56. Goodman KJ, Correa P, Tenganá Aux HJ, DeLany JP, Collazos T. Nutritional factors and *Helicobacter pylori* infection in Colombian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997;25(5):507–15.
57. Fahey JW, Stephenson KK, Wallace AJ. Dietary amelioration of *Helicobacter* infection. *Nutr Res*. 2015;35(6):461–73.
58. Yordanov D, Boyanova L, Markovska R, Ilieva J, Andreev N, Gergova G, *et al*. Influence of dietary factors on *Helicobacter pylori* and CagA seroprevalence in Bulgaria. *Gastroenterol Res Pract*. 2017;2017:1–7.
59. Ornelas IJ, Galvan-Potrillo M, López-Carrillo L. Protective effect of yoghurt consumption on *Helicobacter pylori* seropositivity in a Mexican population. *Public Health Nutr [Internet]*. 2007 Nov [citado el 26 de octubre de 2017];10(11). Disponible en: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S1368980007696372](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1368980007696372)
60. Carreira H, Bastos A, Peleteiro B, Lunet N. Breast-feeding and *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutr*. 2015;18(3):500–20.
61. Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection: Genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med*. 1994;120(12):982–6.
62. Mărginean MO, Mărginean CO, Meliș LE, Voidăzan S, Moldovan V, Bănescu C. The impact of host's genetic susceptibility on *Helicobacter pylori* infection in children. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(30):e7612.
63. Zambon C-F, Basso D, Navaglia F, Belluco C, Falda A, Fogar P, *et al*. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: Interactions influence outcome. *Cytokine*. 2005;29(4):141–52.
64. Mayerle J, den Hoed CM, Schurmann C, Stolk L, Homuth G, Peters MJ, *et al*. Identification of genetic loci associated with *Helicobacter pylori* serologic status. *JAMA*. 2013;309(18):1912–20.
65. Sung H, Camargo MC, Yu K, Weinstein SJ, Morgan DR, Albanes D, *et al*. Association of 4p14 TLR locus with antibodies to *Helicobacter pylori*. *Genes Immun*. 2015;16(8):567–70.
66. Zhang J, Sun X, Wang J, Zhang F, Li X, Han J. Association of the *IL-1RN* variable number of tandem repeat polymorphism and *Helicobacter pylori* infection: A meta-analysis. Wei Q, editor. *PLOS ONE*. 2017;12(4):e0175052.
67. Salama NR, Hartung ML, Müller A. Life in the human stomach: Persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(6):385–99.

68. Correa P, Piazzuelo MB. *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. US Gastroenterol Hepatol Rev. 2011;7(1):59–64.
69. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006;19(3):449–90.
70. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. Clin Microbiol Rev. 2010;23(4):713–39.
71. Backert S, König W, Arnold R, König B. Induction and modulation of inflammatory networks by bacterial protein toxins. In: The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. Tercera. Amsterdam ; Boston: Elsevier; 2006. p. 887–918.
72. Correa P, Piazzuelo MB. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. Dig Liver Dis. 2008;40(7):490–6.
73. Siddheshwar RK, Muhammad KB, Gray JC, Kelly SB. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in patients with colorectal polyps and colorectal carcinoma. Am J Gastroenterol. 2001;96(1):84–8.
74. Sonnenberg A, Genta RM. *Helicobacter pylori* is a risk factor for colonic neoplasms. Am J Gastroenterol. 2013;108(2):208–15.
75. Trikudanathan G, Philip A, Dasanu CA, Baker WL. Association between *Helicobacter pylori* infection and pancreatic cancer. A cumulative meta-analysis. J Pancreas. 2011;12(1):26–31.
76. Xiao M, Wang Y, Gao Y. Association between *Helicobacter pylori* infection and pancreatic cancer development: A meta-analysis. PLoS ONE. 2013;8(9):e75559.
77. Wang Y, Zhang F-C, Wang Y-J. *Helicobacter pylori* and pancreatic cancer risk: A meta-analysis based on 2,049 cases and 2,861 controls. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(11):4449–54.
78. Chen X-Z, Wang R, Chen H-N, Hu J-K. Cytotoxin-associated gene A-negative strains of *Helicobacter pylori* as a potential risk factor of pancreatic cancer: A meta-analysis based on nested case-control studies. Pancreas. 2015;44(8):1340–4.
79. Murphy G, Michel A, Taylor PR, Albanes D, Weinstein SJ, Virtamo J, *et al.* Association of seropositivity to *Helicobacter* species and biliary tract cancer in the ATBC study. Hepatology. 2014;60(6):1963–71.
80. Mounika P. *Helicobacter pylori* infection and risk of lung cancer: A meta-analysis. Lung Cancer Int. 2013;2013:1–6.
81. Rezaii J, Tavakoli H, Esfandiari K, Ashegh H, Hasibi M, Ghanei G, *et al.* Association between *Helicobacter pylori* infection and laryngo-hypopharyngeal carcinoma: A case-control study and review of the literature. Head Neck. 2008;30(12):1624–7.
82. De Korwin J-D, Ianiro G, Gibiino G, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* infection and extragastric diseases in 2017. Helicobacter. 2017;22:e12411.
83. Balsalobre-Arenas L, Alarcón-Cavero T. Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 2017;35(6):367–76.
84. Gisbert JP, Calvet X, Bermejo F, Boixeda D, Bory F, Bujanda L, *et al.* III Conferencia Española de Consenso sobre la infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Hepatol. 2013;36(5):340–74.
85. Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, *et al.* Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut. 2017;66(1):6–30.
86. Michel A, Waterboer T, Kist M, Pawlita M. *Helicobacter pylori* multiplex serology. Helicobacter. 2009;14(6):525–35.

87. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park JY, Crowe SE, *et al.* The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43(4):514–33.
88. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318–27.
89. Gisbert JP, Molina-Infante J, Amador J, Bermejo F, Bujanda L, Calvet X, *et al.* IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Hepatol.* 2016;39(10):697–721.
90. Jones NL, Koletzko S, Goodman K, Bontems P, Cadranet S, Casswall T, *et al.* Joint ESPGHAN/NASPGHAN Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* in children and adolescents (Update 2016). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;64(6):991–1003.
91. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 1994 p. 1–241. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans). Report No.: 61.
92. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31–49.
93. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet.* 1975;2(7924):58–60.
94. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2007;133(2):659–72.
95. Marqués-Lespier JM, González-Pons M, Cruz-Correa M. Current perspectives on gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2016;45(3):413–28.
96. Servetas SL, Bridge DR, Merrell DS. Molecular mechanisms of gastric cancer initiation and progression by *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29(3):304–10.
97. Dong E, Duan L, Wu BU. Racial and ethnic minorities at increased risk for gastric cancer in a regional US population study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(4):511–7.
98. Brawner KM, Morrow CD, Smith PD. Gastric microbiome and gastric cancer. *Cancer J.* 2014;20(3):211–6.
99. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United Eur Gastroenterol J.* 2015;3(3):255–60.
100. Coker OO, Dai Z, Nie Y, Zhao G, Cao L, Nakatsu G, *et al.* Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut.* 2017;gutjnl – 2017–314281.
101. Sheh A, Fox JG. The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Gut Microbes.* 2013;4(6):505–31.
102. Kao C-Y, Sheu B-S, Wu J-J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J.* 2016;39(1):14–23.
103. Gu H. Role of flagella in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Curr Microbiol.* 2017;74(7):863–9.
104. Zhong Y, Anderl F, Kruse T, Schindele F, Jagusztyn-Krynicka EK, Fischer W, *et al.* *Helicobacter pylori* HP0231 influences bacterial virulence and is essential for gastric colonization. *PLOS ONE.* 2016;11(5):e0154643.
105. Howson CP, Hiyama T, Wynder EL. The decline in gastric cancer: Epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev.* 1986;8:1–27.



106. Ekström AM, Serafini M, Nyrén O, Hansson LE, Ye W, Wolk A. Dietary antioxidant intake and the risk of cardia cancer and noncardia cancer of the intestinal and diffuse types: A population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer*. 2000;87(1):133–40.
107. Epplein M, Nomura AMY, Hankin JH, Blaser MJ, Perez-Perez G, Stemmermann GN, *et al.* Association of *Helicobacter pylori* infection and diet on the risk of gastric cancer: A case-control study in Hawaii. *Cancer Causes Control*. 2008;19(8):869–77.
108. Zumkeller N, Brenner H, Zwahlen M, Rothenbacher D. *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: A meta-analysis. *Helicobacter*. 2006;11(2):75–80.
109. Zhao Y, Wang F, Chang D, Han B, You D. Meta-analysis of different test indicators: *Helicobacter pylori* infection and the risk of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23(9):875–82.
110. Hong SN, Lee SM, Kim JH, Lee TY, Kim JH, Choe WH, *et al.* *Helicobacter pylori* infection increases the risk of colorectal adenomas: Cross-sectional study and meta-analysis. *Dig Dis Sci*. 2012;57(8):2184–94.
111. Chen Y-S, Xu S-X, Ding Y-B, Huang X-E, Deng B. *Helicobacter pylori* infection and the risk of colorectal adenoma and adenocarcinoma: An updated meta-analysis of different testing methods. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(12):7613–9.
112. Rokkas T, Sechopoulos P, Pistiolas D, Kothonas F, Margantinis G, Koukoulis G. The relationship of *Helicobacter pylori* infection and colon neoplasia, on the basis of meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2013;25(11):1286–94.
113. Wu Q, Yang Z-P, Xu P, Gao L-C, Fan D-M. Association between *Helicobacter pylori* infection and the risk of colorectal neoplasia: A systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2013;15(7):e352–64.
114. Guo Y, Li H-Y. Association between *Helicobacter pylori* infection and colorectal neoplasm risk: A meta-analysis based on East Asian population. *J Cancer Res Ther*. 2014;10 Suppl:263–6.
115. Liu C, Zheng P. The relationship of *Helicobacter pylori* infection and the risk of colon neoplasia based on meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(2):2293–300.
116. Chang AH, Parsonnet J. Role of bacteria in oncogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(4):837–57.
117. Tatishchev SF, Vanbeek C, Wang HL. *Helicobacter pylori* infection and colorectal carcinoma: Is there a causal association? *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(4):380–5.
118. Papastergiou V. *Helicobacter pylori* and colorectal neoplasia: Is there a causal link? *World J Gastroenterol*. 2016;22(2):649.
119. Gao L, Michel A, Weck MN, Arndt V, Pawlita M, Brenner H. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk: Evaluation of 15 *H. pylori* proteins determined by novel multiplex serology. *Cancer Res*. 2009;69(15):6164–70.
120. Song H, Michel A, Nyrén O, Ekström A-M, Pawlita M, Ye W. A CagA-independent cluster of antigens related to the risk of noncardia gastric cancer: Associations between *Helicobacter pylori* antibodies and gastric adenocarcinoma explored by multiplex serology. *Int J Cancer*. 2014;134(12):2942–50.
121. Epplein M, Zheng W, Xiang Y-B, Peek RM, Li H, Correa P, *et al.* Prospective study of *Helicobacter pylori* biomarkers for gastric cancer risk among Chinese men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(12):2185–92.
122. Murphy G, Freedman ND, Michel A, Fan J-H, Taylor PR, Pawlita M, *et al.* Prospective study of *Helicobacter pylori* antigens and gastric noncardia cancer risk in the nutrition intervention trial cohort: *Helicobacter pylori* antigens and gastric noncardia cancer risk. *Int J Cancer*. 2015;137(8):1938–46.

123. Shakeri R, Malekzadeh R, Nasrollahzadeh D, Pawlita M, Murphy G, Islami F, *et al.* Multiplex *H. pylori* serology and risk of gastric cardia and non-cardia adenocarcinomas. *Cancer Res.* 2015;75(22):4876–83.
124. Epplein M, Pawlita M, Michel A, Peek RM, Cai Q, Blot WJ. *Helicobacter pylori* protein-specific antibodies and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(11):1964–74.
125. Blase JL, Campbell PT, Gapstur SM, Pawlita M, Michel A, Waterboer T, *et al.* Prediagnostic *Helicobacter pylori* antibodies and colorectal cancer risk in an elderly, caucasian population. *Helicobacter.* 2016;21(6):488–492.
126. Castaño-Vinyals G, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Martín V, Llorca J, Moreno V, *et al.* Population-based multicase-control study in common tumors in Spain (MCC-Spain): Rationale and study design. *Gac Sanit.* 2015;29(4):308–15.
127. Klaamas K, Held M, Wadström T, Lipping A, Kurtenkov O. IgG immune response to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and immunoblotting. *Int J Cancer.* 1996;67(1):1–5.
128. Sörberg M, Engstrand L, Ström M, Jönsson K-Å, Jörbeck H, Granström M. The diagnostic value of Enzyme Immunoassay and Immunoblot in monitoring eradication of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis.* 1997;29(2):147–51.
129. Vrijheid M, Deltour I, Krewski D, Sanchez M, Cardis E. The effects of recall errors and of selection bias in epidemiologic studies of mobile phone use and cancer risk. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2006;16(4):371–84.
130. Sgouras DN, Trang TTH, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2015;20:8–16.
131. Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology.* 1998;114(6):1169–79.
132. Kamangar F, Dawsey SM, Blaser MJ, Perez-Perez GI, Pietinen P, Newschaffer CJ, *et al.* Opposing risks of gastric cardia and noncardia gastric adenocarcinomas associated with *Helicobacter pylori* seropositivity. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(20):1445–52.
133. Helicobacter and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: A combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut.* 2001;49(3):347–53.
134. Michel A, Pawlita M, Boeing H, Gissmann L, Waterboer T. *Helicobacter pylori* antibody patterns in Germany: A cross-sectional population study. *Gut Pathog.* 2014;6:10.

## 9. ANEXOS

---

## Artículo 1

### ***Helicobacter pylori* serological biomarkers of gastric cancer risk in the MCC-Spain case-control Study**

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2017.08.002>

#### Resumen

#### **Biomarcadores de riesgo de cáncer gástrico relacionados con la serología frente a *Helicobacter pylori* en el estudio de casos y controles MCC-Spain**

**Antecedentes:** la infección por *Helicobacter pylori* es uno de los factores de riesgo principales de cáncer gástrico no-cardias. Sin embargo, solo una pequeña proporción de las personas infectadas desarrollan la enfermedad.

**Objetivo:** identificar biomarcadores serológicos de infección por *H. pylori* relacionados con el riesgo de cáncer gástrico.

**Metodología:** en este estudio se incluyeron casos incidentes de cáncer gástrico y controles poblacionales (emparejados por edad, sexo y provincia) participantes en el estudio multicaso-control MCC-Spain. Se determinó la serorreactividad frente a 16 proteínas de *H. pylori* mediante serología múltiple para *H. pylori*. La infección por *H. pylori* se definió como la positividad frente a cuatro o más proteínas. Se analizó la asociación entre los resultados serológicos y el riesgo de cáncer gástrico no-cardias y cardias mediante modelos mixtos de regresión logística multivariable y análisis de componentes principales.

**Resultados:** la seroprevalencia fue del 88% entre los 2071 controles, del 95% entre los 202 casos de cáncer gástrico no-cardias (OR=1,9 [IC 95%: 1,0-3,6] y del 85% entre los 62 casos de cáncer gástrico de cardias (OR=0,5 [IC 95%: 0,3-1,1]). Entre los participantes infectados, la seropositividad frente a las proteínas UreA, HP231, NapA y Cag $\delta$  se asoció con un riesgo menor de cáncer gástrico no-cardias, mientras que la seropositividad frente a CagA y a VacA se asoció con un riesgo mayor. La seropositividad frente a CagA y la seronegatividad frente a Cag $\delta$  se mantuvieron como indicadores de riesgo tras ajustar por el serostatus frente a las demás proteínas asociadas con el riesgo de cáncer gástrico en el análisis individual. Identificamos dos patrones de reactividad de anticuerpos: un “patrón virulento”, asociado con un riesgo tres veces mayor de

---

cáncer gástrico no-cardias y un “patrón no virulento”, asociado con un riesgo un 60% menor (cuarto cuartil comparado con el primer cuartil).

**Conclusiones:** en la población estudiada, las personas seropositivas frente a *H. pylori* se caracterizaron por dos patrones de reactividad de anticuerpos frente a proteínas de *H. pylori*: 1) Patrón de serorreactividad alta frente a varias proteínas, asociado con un riesgo menor de cáncer gástrico no-cardias, y 2) Patrón de serorreactividad alta frente a las proteínas CagA y VacA, asociado con un riesgo mayor de cáncer gástrico no-cardias.



Contents lists available at ScienceDirect

## Cancer Epidemiology

The International Journal of Cancer Epidemiology, Detection, and Prevention

journal homepage: [www.cancerepidemiology.net](http://www.cancerepidemiology.net)

## *Helicobacter pylori* serological biomarkers of gastric cancer risk in the MCC-Spain case-control Study

Nerea Fernández de Larrea-Baz<sup>a,b,\*</sup>, Beatriz Pérez-Gómez<sup>a,b</sup>, Angelika Michel<sup>c</sup>, Beatriz Romero<sup>d</sup>, Virginia Lope<sup>a,b</sup>, Michael Pawlita<sup>c</sup>, Tania Fernández-Villa<sup>e,f</sup>, Victor Moreno<sup>g,h,i,b</sup>, Vicente Martín<sup>e,f,b</sup>, Martina Willhauck-Fleckenstein<sup>c</sup>, Gonzalo López-Abente<sup>a,b</sup>, Jesús Castilla<sup>j,b</sup>, Guillermo Fernández-Tardón<sup>k,b</sup>, Trinidad Dierssen-Sotos<sup>l,b</sup>, Miguel Santibáñez<sup>l,m</sup>, Rosana Peiró<sup>n,b</sup>, José Juan Jiménez-Moleón<sup>o,p,b</sup>, Carmen Navarro<sup>q,r,b</sup>, Gemma Castaño-Vinyals<sup>s,t,u,b</sup>, Manolis Kogevinas<sup>s,t,u,b</sup>, Marina Pollán<sup>a,b</sup>, Silvia de Sanjosé<sup>v,b</sup>, Rosa del Campo<sup>d,w</sup>, Tim Waterboer<sup>c</sup>, Nuria Aragonés<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Environmental and Cancer Epidemiology Area, National Center of Epidemiology, Carlos III Health Institute (ISCIII), Avda. Monforte de Lemos 5, 28029, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)-CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Avda. Monforte de Lemos, 3-5, Pabellón 11, Planta 0, 28029, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Division of Molecular Diagnostics of Oncogenic Infections, Infection, Inflammation and Cancer Program, German Cancer Research Center (DKFZ), Im Neuenheimer Feld 280, 69120, Heidelberg, Germany

<sup>d</sup> Department of Microbiology, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)-Ramón y Cajal Health Research Institute (IRYCIS), Ctra. de Colmenar Viejo km. 9,100, 28034, Madrid, Spain

<sup>e</sup> The Research Group in Gene - Environment and Health Interactions (GIIGAS), University of León, Spain

<sup>f</sup> Department of Biomedical Sciences, Area of Preventive Medicine and Public Health, University of León, Campus de Vegazana s/n, 24071, León, Spain

<sup>g</sup> Cancer Prevention and Control Program, Catalan Institute of Oncology, Avinguda de la Granvia de l'Hospitalet 199-203, 08908, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>h</sup> Department of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Gran Via de les Corts Catalanes, 585, 08007, Barcelona, Spain

<sup>i</sup> Colorectal Cancer Group, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Gran Via de l'Hospitalet, 199, 08908, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>j</sup> Instituto de Salud Pública de Navarra, IdISNA-Navarra Institute for Health Research, C/Leyre, 15, 31003, Pamplona, Spain

<sup>k</sup> University Institute of Oncology (IUOPA), University of Oviedo, Fernando Bonger. Building "Santiago Gascón", 1 st Floor, Campus of "El Cristo" B, 33006, Oviedo, Asturias, Spain

<sup>l</sup> University of Cantabria – IDIVAL-Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla-Marqués de Valdecilla Research Institute (IDIVAL), C/ Cardenal Herrera Oria, s/n, 39011, Santander, Spain

<sup>m</sup> Centro de Investigación en Recursos Naturales, Salud, y Medio Ambiente (RENSMA), University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007, Huelva, Spain

<sup>n</sup> Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana FISABIO-Salud Pública – Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research of Valencia Region (FISABIO), Avda. de Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain

<sup>o</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA)-Granada Health Research Institute (ibs.GRANADA), 18012, Granada, Spain

<sup>p</sup> Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Granada, Avda. de la Investigación, 11, Building A, 8th Floor, 18016, Granada, Spain

<sup>q</sup> Department of Epidemiology, Murcia Regional Health Council, IMIB-Arrixaca, Ronda de Levante, 11, 2ª planta, 30008, Murcia, Spain

<sup>r</sup> Department of Health and Social Sciences, University of Murcia, Avda. Teniente Flomesta, 5, 30003, Murcia, Spain

<sup>s</sup> ISGlobal, Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Doctor Aiguader, 88, 08003, Barcelona, Spain

<sup>t</sup> IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Dr. Aiguader, 88, 08003, Barcelona, Spain

<sup>u</sup> Pompeu Fabra University (UPF), Plaça de la Mercè, 10-12, 08002, Barcelona, Spain

<sup>v</sup> Cancer Epidemiology Research Program, Catalan Institute of Oncology-IDIBELL, Avinguda de la Granvia de l'Hospitalet 199-203, 08908, l'Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>w</sup> Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI)-Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI), Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 April 2017

Received in revised form 10 July 2017

## ABSTRACT

**Background:** *Helicobacter pylori* infection is one of the main risk factors for non-cardia gastric cancer. However, only a minority of infected persons develop the disease. This study aims at identifying *H. pylori* related serological biomarkers of risk for gastric cancer.

**Methods:** Incident gastric cancer cases and population controls (age, sex and region frequency-matched)

\* Corresponding author at: Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Avda. Monforte de Lemos 5, 28029, Madrid, Spain.  
E-mail address: [nfernandez@externos.isciii.es](mailto:nfernandez@externos.isciii.es) (N. Fernández de Larrea-Baz).



Accepted 4 August 2017  
Available online xxx

#### Keywords:

Gastric neoplasm  
*Helicobacter pylori* infection  
Multiplex serology  
Biomarkers  
Case-control studies

from the MCC-Spain multicase-control Study were included. Seroreactivities against 16 *H. pylori* proteins were determined using multiplex serology. Infection was defined as seropositivity against  $\geq 4$  proteins. Relation of serological results to non-cardia and cardia gastric cancer was assessed using multivariable mixed logistic regression and principal components analysis.

**Results:** Seroprevalence was 88% among 2071 controls, 95% among 202 non-cardia gastric cancer cases (OR = 1.9 (95% CI: 1.0–3.6)) and 85% among 62 cardia cancer cases (OR = 0.5 (95% CI: 0.3–1.1)). In infected subjects, seropositivity for UreA, HP231, NapA and Cag $\delta$  was associated with lower non-cardia gastric cancer risk, while seropositivity for CagA and VacA was associated with higher risk. Seropositivity for CagA and seronegativity for Cag $\delta$  maintained the association after additional adjustment by serostatus of significant proteins. We identified two antibody reactivity patterns: the “virulent-pattern”, related to a threefold higher risk of non-cardia gastric cancer and the “non-virulent pattern”, related to a 60% decreased risk (4th vs. first quartile).

**Conclusions:** In our population, people seropositive for *H. pylori* were characterized by two patterns of antibody reactivity against *H. pylori* proteins: 1) Combined high seroreactivity against several proteins, associated with a lower non-cardia gastric cancer risk, and 2) High seroreactivity against CagA and VacA, associated with an increased risk.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

In spite of a marked decreasing trend in its incidence and mortality in the last decades, gastric cancer continues to be the third leading cause of cancer death in the world. Mortality rates are especially high in certain areas such as Eastern Asia, Central and Eastern Europe and South America [1,2]. In Spain, the estimated age-standardized incidence and mortality rates (European Standard Population) in 2012 were 16.4 per 100,000 population in men and 7.5 in women [3], and 11.3 per 100,000 population in men and 5.2 in women, respectively [4], slightly over the European Union mean rates.

Geographic variations have also been observed within countries [5–7]. In Spain gastric cancer mortality displays a singular geographical pattern, with higher mortality rates in Central and Northern regions [8,9]. This pattern, characterized by its similarity in both sexes, has not changed substantially over the last decades [10,11]. Although differences in mortality among regions can be partially associated with different dietary habits or with territorially-related environmental exposures, differences in the epidemiology of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection are probably also implicated in the observed pattern, given the high population attributable fraction estimated for chronic infection with this bacterium in gastric cancer [12].

Chronic infection with *H. pylori* is the strongest established causal factor for the development of gastric cancer [13]. This association has been reported to be higher, and even limited to, cancer localized distal to the esophagogastric junction, the so called non-cardia gastric cancer, with risk estimates around 2.8 for non-cardia gastric cancer and 1.1 for cardia gastric cancer [14]. The prevalence of *H. pylori* infection is over 50% worldwide, with marked geographical variations [15]. Though higher prevalence is usually reported for developing countries [16–18], prevalences over 70% have been reported in specific Western populations, including some Portuguese and Spanish regions [19–21]. Fortunately, only about 1% of the infected people develop a gastric cancer. Specific microbial strains and phenotypes have been linked to a higher risk of gastric cancer, and several related virulence factors are currently recognized [22,23]. Also, different host and environmental factors have been shown to interact and modulate individual risk [24,25]. Therefore, the identification of markers of increased or decreased cancer risk is a crucial issue to inform decisions about the management of the infection, both at individual and at population level.

*H. pylori* multiplex serology is a recently developed technique that allows the simultaneous and quantitative detection of antibody reactivity against different antigens in a high throughput

assay, which makes this technique appropriate for large epidemiological studies [26]. By means of multiplex serology we quantified seroreactivity against a wide range of *H. pylori* proteins in a well characterized group of gastric cancer cases and healthy controls.

The aim of this study is to assess the relation between serological reactivity to 16 *H. pylori* proteins and the development of gastric cancer, differentiating non-cardia and cardia gastric cancer, in order to identify serological markers of gastric cancer risk.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study population

MCC-Spain study ([www.mccspain.org](http://www.mccspain.org)) is a multicase-control study with population controls that was carried out in 12 Spanish provinces to study environmental and genetic risk factors for five types of tumors: colorectal, breast, esophagogastric, prostate and chronic lymphocytic leukemia [27]. Cases were recruited between 2008 and 2013 in 23 hospitals and controls were frequency-matched to cases by age, sex and region (province). In each province, at least two types of cancer cases were recruited and a common set of controls was selected for all their cases. To obtain an age and sex frequency-matched sample, an initial estimation of the expected distribution of these variables among cases recruited in each province was made, taking into account data from the Spanish cancer registries. In a second step, homogeneity in the age-sex distribution between the pool of recruited cases and the controls was checked, and additional controls were invited to participate when needed to assure the availability, in each province, of at least one control of the same sex and age ( $\pm 5$  years) for each case. Selection of controls was done through a random procedure from the General Practitioner's lists at primary healthcare centers of the hospitals' catchment areas. Cases and controls had to fulfill the following selection criteria: to have lived for at least 6 months in the study areas, to be 20–85 years old and to be able to answer the epidemiological questionnaire. Gastric cancer cases were recruited in 15 hospitals from 9 Spanish provinces (Asturias, Barcelona, Cantabria, Granada, Huelva, León, Madrid, Navarra and Valencia). Eligible cases included histologically confirmed incident gastroesophageal cancer cases (International Classification of Diseases 10th Revision (ICD-10) codes C16, D00.2 or C15.5) diagnosed during the recruitment period and with no personal history of gastroesophageal cancer. We also recruited cases with tumor in the lower third of the esophagus to be able to include all adenocarcinomas of the esophagogastric junction. Cases were classified as cardia, non-cardia and others (tumors overlapping cardia and non-



cardia or with non-specified gastric location). We identified 923 gastric cancer cases and 7734 controls potentially eligible. Response rates varied by center and on average were 57% in cases and 53% in controls. Among the common set of controls, that was unique for the five types of cancer cases studied in MCC-Spain, for this analysis we excluded those with personal history of gastro-esophageal cancer, those from provinces that did not recruit gastric cancer cases and those more than five years younger than the youngest gastric cancer case in each province. Finally, 459 cases and 3 440 matched controls fulfilled selection criteria. One of these cases and six controls were excluded for this analysis because they pertained to a province where only one gastric cancer case was recruited. All the participants answered an epidemiological questionnaire administered through personal interviews by

trained personnel and were asked for donation of biological samples (blood, urine, hair and nails). The study protocol was approved by the Review Board of the participating institutions and all the included subjects gave written informed consent to participate.

## 2.2. Serological characterization

Blood samples were refrigerated locally until being processed and aliquoted in the first 48 h. Then, they were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Seroreactivities against 16 *H. pylori* proteins were determined using *H. pylori* multiplex serology (Supplementary Table S1). Multiplex serology is a glutathione S-transferase capture immunosorbent assay combined with fluorescent-bead technology, as

**Table 1**  
Characteristics of gastric cancer cases and controls.

		CONTROLS N (%)	GC CASES N <sup>a</sup> (%)		p-value cardia	p-value non-cardia
			Cardia	Non-cardia		
Variable		(N = 2071)	(N = 62)	(N = 202)		
Sex	Male	1183 (57%)	54 (87%)	126 (62%)	<0.001	0.149
	Female	888 (43%)	8 (13%)	76 (38%)		
Age (years)	<55	391 (19%)	13 (21%)	36 (18%)	0.023	0.001
	55–64	492 (24%)	17 (27%)	30 (15%)		
	65–74	731 (35%)	11 (18%)	70 (35%)		
	≥75	457 (22%)	21 (34%)	66 (33%)		
Race	White/Caucasian	2036 (98%)	61 (98%)	193 (96%)	0.991	0.004
	Other	33 (2%)	1 (2%)	9 (4%)		
Education	No/incomplete primary school	427 (21%)	18 (29%)	61 (30%)	0.335	0.003
	Primary school	784 (38%)	24 (39%)	79 (39%)		
	Secondary school	528 (25%)	13 (21%)	42 (21%)		
	University degree	332 (16%)	7 (11%)	20 (10%)		
Socioeconomic level at birth	Low	902 (47%)	33 (53%)	110 (55%)	0.451	0.133
	Intermediate	943 (49%)	26 (42%)	85 (42%)		
	High	62 (3%)	3 (5%)	6 (3%)		
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	< 25	599 (34%)	16 (27%)	66 (35%)	0.410	0.894
	25–29.9	816 (46%)	27 (46%)	83 (44%)		
	≥30	372 (21%)	16 (27%)	40 (21%)		
Smoking status	Never smoker	907 (44%)	18 (29%)	88 (44%)	0.004	0.595
	Former smoker	734 (36%)	21 (34%)	67 (33%)		
	Current smoker	421 (20%)	23 (37%)	47 (23%)		
GC family history	No GC family history	1817 (88%)	50 (82%)	155 (78%)	0.031	<0.001
	Only 2nd degree relatives	111 (5%)	2 (3%)	13 (7%)		
	≥1 first degree relative	132 (6%)	9 (15%)	32 (16%)		
History of gastritis	No	1844 (96%)	56 (92%)	187 (93%)	0.063	0.020
	Yes	69 (4%)	5 (8%)	14 (7%)		
History of heartburn	No	1232 (65%)	35 (57%)	103 (52%)	0.248	<0.001
	Yes	676 (35%)	26 (43%)	97 (49%)		
Histological type	AC	–	60 (97%)	186 (92%)	NA	NA
	Other	–	2 (3%)	16 (8%)		
Laurén classification <sup>b</sup>	Intestinal	–	21 (35%)	81 (44%)	NA	NA
	Diffuse	–	7 (12%)	51 (27%)		
	Mixed	–	32 (53%)	9 (5%)		
	Not available	–	0 (0%)	45 (24%)		
WHO classification <sup>b</sup>	Papillary/Tubular	–	19 (32%)	76 (41%)	NA	NA
	Mucinous	–	2 (3%)	5 (3%)		
	Poorly cohesive	–	8 (13%)	54 (29%)		
	Mixed	–	1 (2%)	10 (5%)		
	Not available	–	30 (50%)	41 (22%)		
Tumor stage	Localized (TNM stages 0–II)	–	9 (17%)	69 (39%)	NA	NA
	Advanced (TNM stages III–IV)	–	45 (83%)	106 (61%)		
Blood collection moment	Prior/concomitant to treatment	–	28 (50%)	86 (45%)	NA	NA
	First 2 months after treatment	–	14 (25%)	65 (34%)		
	>2 months after treatment	–	14 (25%)	41 (21%)		
Initial treatment	Surgery	–	28 (50%)	164 (82%)	NA	NA
	Chemotherapy	–	25 (45%)	36 (18%)		
	Chemo-radiotherapy	–	3 (5%)	0 (%)		

Sum of cases in some variables does not coincide with overall number of cases because of missing information. Cases and controls are not balanced by age and sex in spite of the frequency-matching, because matching was made based on the distribution of all the types of cancer cases recruited in each province, and gastric cancer cases were in general older and more frequently men than cases of other tumors. AC: Adenocarcinoma; BMI: Body mass index; GC: Gastric cancer; WHO: World Health Organization; NA: Not Applicable.

<sup>a</sup> Seventeen cases excluded from site-specific analyses (8 not classifiable as cardia or non-cardia gastric cancer and 9 located in the esophageal lower third).

<sup>b</sup> Only applicable to adenocarcinomas.



described elsewhere [28]. This technique simultaneously quantifies antibodies directed against arrays of protein antigens. In brief, bacterially expressed recombinant glutathione S-transferase-*H. pylori* fusion proteins were used as antigens. The fusion proteins were loaded and affinity-purified directly on individual sets of spectrally distinct glutathione-casein-coupled fluorescence-labelled polystyrene beads (SeroMap, Luminex, Austin, TX). Bead sorts, each carrying a different antigen, were mixed and incubated with human sera at 1:100 dilutions. Antibodies bound to the beads via the bacterial antigens were stained by biotinylated anti-human-IgA, IgM, IgG (Dianova, Hamburg, Germany) and streptavidin-R-phycoerythrin. Beads were examined in a Luminex 200 analyzer that quantifies the antibody bound to bacterial antigen via the median R-phycoerythrin fluorescence intensity of at least 100 beads of the same internal color. Net (bead and glutathione S-transferase background subtracted) Median reporter Fluorescence Intensity values were calculated and negative values were set to +1.

For *H. pylori* proteins, serostatus cut-offs were calculated (mean of the median reporter fluorescence intensity + 3 standard deviations, excluding positive outliers) in 17 *H. pylori* negative sera previously classified for *H. pylori* status run within the same experiment. According to these cut-offs (Supplementary Table S1), each participant was classified as seropositive or seronegative for each protein. Following previously published criteria, *H. pylori* seropositivity was defined as positivity for at least 4 of the 15 *H. pylori* proteins (excluding HomB, a protein recently added to *H. pylori* multiplex serology), and subjects fulfilling this criteria were considered infected [26].

### 2.3. Statistical analyses

Association of proposed gastric cancer risk factors with case-control status was analyzed by means of Chi-squared test.

To study the association between serological results and gastric cancer, odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) were estimated using multilevel logistic regression mixed models, with province as a random effect term and the following variables as fixed effects terms: age, sex, education, smoking status and gastric cancer family history. This analysis was performed in the overall sample to assess the effect of *H. pylori* seropositivity.

Then, to identify infected people at higher risk of developing gastric cancer, analyses assessing serostatus of individual proteins

were performed in the infected subsample. Subsequently, to study the independent effect of seropositivity against proteins found to be associated with non-cardia cancer risk at a p-value < 0.10, a multivariable logistic regression model was fitted simultaneously including serostatus of all of them in addition to potential confounding factors.

Finally, to account for a possibly high collinearity among antibody reactivities against analyzed proteins, and in order to identify antibody response patterns, a principal components analysis was carried out. The principal components analysis was performed using the control population, and reactivity values of each tested antibody were standardized to a mean of 0 and a standard deviation of 1. Selection of relevant components was done taking into account obtained eigenvalues and clinical interpretability of the components arising from the analysis. To assess the relation of the selected components with non-cardia gastric cancer risk, the score for each component was calculated for each case and control. Then scores were categorized, according to quartiles of their distribution among controls, and included in a multivariable logistic regression mixed model, to estimate the association between gastric cancer risk and the obtained components. These models were adjusted by the same covariates as the models described above (with province as a random effect term and age, sex, education, smoking status and gastric cancer family history as fixed effects terms).

### 3. Results

Among participants fulfilling selection criteria, *H. pylori* serostatus could be determined in 281 cases (202 non-cardia gastric cancer, 62 cardia gastric cancer, 9 located in the esophageal lower third and 8 with overlapping or not classifiable tumor location) and 2 071 matched controls, and were therefore included in the present analyses. Reasons for the lack of *H. pylori* serostatus information were: No consent for blood sample collection (156 cases and 637 controls), sample not processed (19 cases and 627 controls) or serological result was considered as non-valid (glutathione S-transferase > 300 median reporter fluorescence intensity) (two cases). Ninety-nine controls were additionally excluded from the analysis because there was not any gastric cancer case in their age, sex and province group.

**Table 2**  
Association between gastric cancer and *H. pylori* infection according to multiplex serology results.

<i>H. pylori</i> serostatus	Controls (N = 2052) N (%)	Cases											
		All (N = 278)	Non-cardia (N = 200)	Cardia (N = 61)	All			Non-cardia			Cardia		
		N (%)	N (%)	N (%)	OR	(95% CI) <sup>a</sup>	p-value	OR	(95% CI) <sup>a</sup>	p-value	OR	(95% CI) <sup>a</sup>	p-value
<i>H. pylori</i> seropositive	1814 (88%)	257 (92%)	189 (95%)	52 (85%)	1.31	(0.82–2.11)	0.263	1.90	(1.01–3.56)	0.047	0.54	(0.25–1.14)	0.105
Number of proteins + <sup>b</sup>	8.2 [3.5]	8.3 [3.1]	8.5 [3.0]	7.6 [3.5]	0.99	(0.95–1.03)	0.705	1.02	(0.97–1.06)	0.485	0.91	(0.84–0.98)	0.018
Number of proteins + (grouped):													
<4	238 (12%)	21 (8%)	11 (6%)	9 (15%)	1.00			1.00			1.00		
4–6	394 (19%)	60 (22%)	44 (22%)	14 (23%)	1.47	(0.86–2.50)	0.157	2.05	(1.03–4.08)	0.040	0.75	(0.31–1.81)	0.528
>6	1420 (69%)	197 (71%)	145 (73%)	38 (62%)	1.27	(0.78–2.05)	0.336	1.85	(0.98–3.50)	0.058	0.48	(0.22–1.04)	0.063
Trend					1.04	(0.85–1.27)	0.733	1.17	(0.92–1.49)	0.207	0.68	(0.48–0.97)	0.036

<sup>a</sup> Adjusted by age, sex, education, family history of gastric cancer and smoking status; province included as a random-effect term. Nineteen controls and three gastric cancer cases (two non-cardia and one cardia gastric cancer cases) were not included in the analyses due to missing information in some of the covariates.

<sup>b</sup> Mean [standard deviation] of the number of proteins against which antibody seroreactivity was above the protein-specific cut-off. In this case, ORs represent the risk for each additional protein against which antibody reactivity was positive.



Compared to controls, non-cardia gastric cancer cases were more likely to be aged 75 or above, no Caucasian, have lower education, have first degree relatives with gastric cancer and self-reported gastritis or heartburn. Cardia gastric cancer cases, compared to controls, were more frequently men, over 74 years old, current smokers and having first degree relatives with gastric cancer (Table 1).

### 3.1. *H. pylori* seroprevalence and gastric cancer risk

According to the established definition of seropositivity to 4 or more *H. pylori* proteins, 88% (95% CI: 87–90) of controls, 95% (95% CI: 91–98) of non-cardia gastric cancer cases and 85% (95% CI: 76–95) of cardia gastric cancer cases were deemed to be infected. Infection was associated with a 90% increased risk of non-cardia gastric cancer ( $p$ -value=0.047) and with a non-statistically significant decrease of cardia gastric cancer risk (OR=0.54; 95% CI: 0.25–1.14). No association was observed between the number of proteins against which a seropositive result was obtained and non-cardia gastric cancer risk; meanwhile, for cardia cancer, a 9% lower risk was estimated for each seropositive protein (Table 2).

### 3.2. Serological response to individual *H. pylori* proteins

In controls, seropositivity to individual *H. pylori* proteins ranged from 31% (Cad) to 83% (GroEL) (Supplementary Fig. S1). Only 1.5% of controls were seronegative to all of the analyzed proteins. The median number of proteins against which controls were seropositive was 9 (Interquartile range: 7–11) in infected controls (those seropositive to 4 or more proteins) and 2 (Interquartile range: 1–3) in non-infected controls. Among cases, seropositivity ranged from 29% for HomB to 89% for GroEL, with a median of 9 proteins seropositive (Interquartile range: 7–11) in infected cases and 2 (Interquartile range: 2–3) in non-infected cases.

### 3.3. Seropositivity for *H. pylori* individual proteins and gastric cancer risk in *H. pylori* positive subjects

Among infected subjects, seropositivity for eight of the analyzed *H. pylori* proteins showed a statistically significant or almost significant association with non-cardia gastric cancer

(Fig. 1): six were associated with a lower risk (UreA, HP231, NapA, Cagδ, Catalase and HcpC) and two (CagA and VacA) with a higher risk. With respect to cardia gastric cancer, HP305 and Cagδ appeared associated with a lower risk (in the limit of the statistical significance).

Results were qualitatively similar between men and women, and between those under and over 65 years old. No differences in the direction of the effects were present and, where differences in the magnitude of the ORs were observed, confidence intervals overlapped (data not shown).

When mutually adjusting by serostatus against those proteins associated at a  $p$ -value < 0.10 with non-cardia gastric cancer risk in the individual analyses, infected subjects seropositive for CagA presented a threefold increased risk of non-cardia gastric cancer (OR=3.65; 95% CI: 2.44–5.46), meanwhile seropositivity for Cagδ was associated with a 34% lower risk (OR=0.66; 95% CI: 0.47–0.92). The association of serostatus against VacA, UreA, HP231, NapA, Catalase and HcpC with non-cardia gastric cancer was not longer statistically significant.

### 3.4. Identification of antibody reactivity patterns

Based on the eigenvalues and interpretability of the patterns, the principal components analysis revealed two serological reactivity patterns. These two components explained the 25% and 11% of total variation in the serological profiles, with eigenvalues of 3.98 and 1.81, respectively. The first component was characterized by moderate weights (Supplementary Table S2) in several of the analyzed antibodies, mainly those against GroEL, NapA, UreA, HyuA, Catalase and HP231 (loadings > 0.3). For the second component, main contributors were CagA and VacA antibody reactivities (loadings > 0.5). Accordingly, the correlation between component scores and seroreactivity for *H. pylori* proteins was higher for these same proteins (Fig. 2). With respect to the association of these two components with non-cardia gastric cancer risk among *H. pylori* infected subjects, high scores in the first one were associated with a 60% lower risk (fourth vs. first quartile), while high scores in the second component were associated with a threefold increased risk (Table 3). The scores in none of the two components were associated with cardia gastric cancer at the statistically significant level (data not shown).

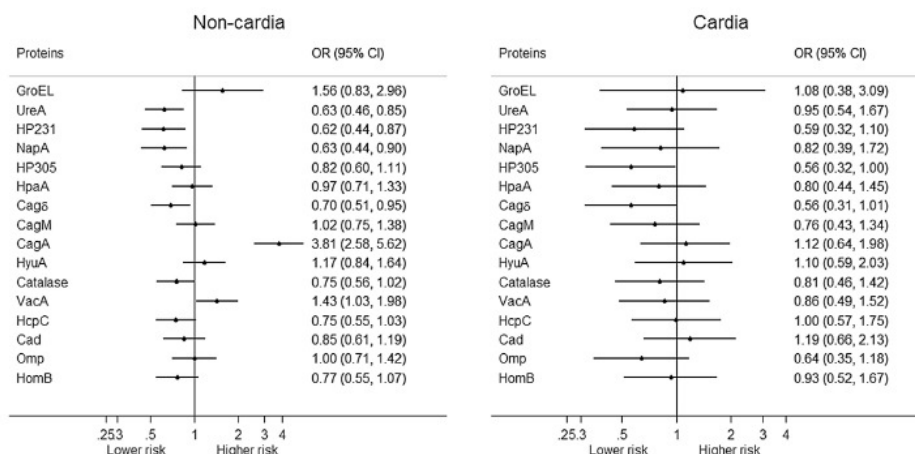


Fig. 1. Association between gastric cancer and positivity for antibody reactivity to *H. pylori* proteins among infected subjects. OR adjusted by age, sex, education, family history of gastric cancer and smoking status; province included as a random-effect term. OR (95% CI): Odds ratio (95% confidence interval).

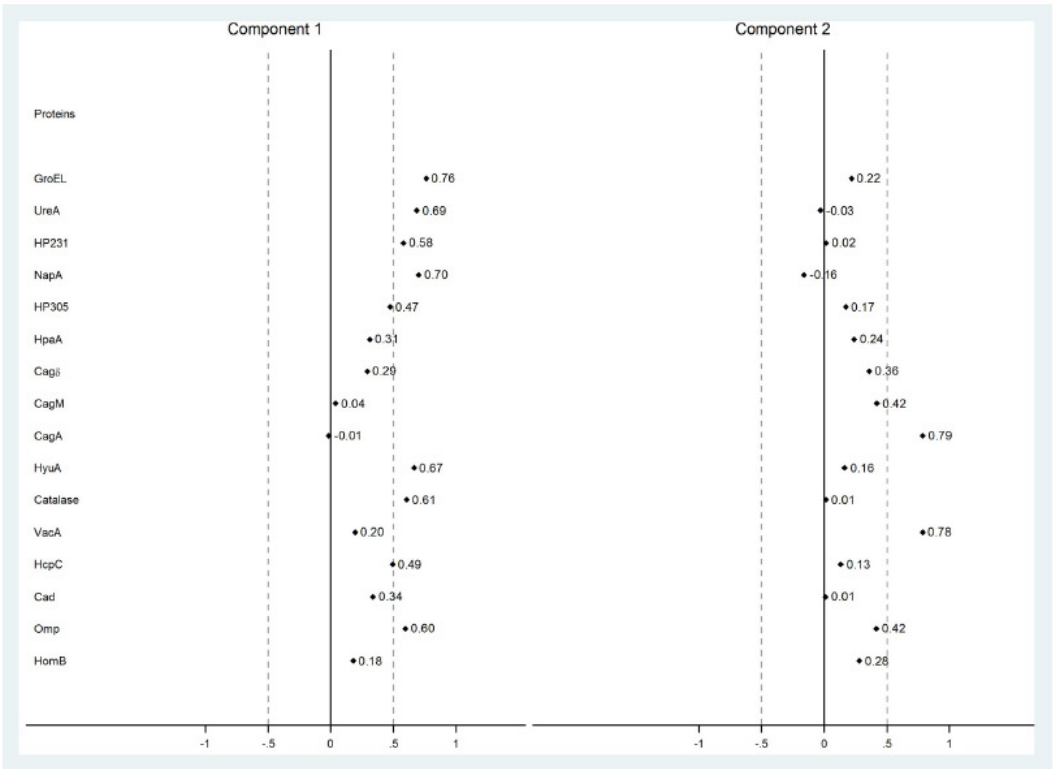


Fig. 2. Principal components analysis results. Correlations between antibody reactivity (MFI) against each *H. pylori* protein and scores in the two selected components. MFI: Median reporter Fluorescence Intensity.

Table 3  
Risk of non-cardia gastric cancer among *H. pylori* infected subjects, according to the scores in the components arising from principal components analysis.

		Controls N (%)	Non-cardia GC N (%)	OR (95% CI)	P-value
Component 1	Q1	457 (25%)	74 (39%)	Reference	
	Q2	459 (25%)	51 (27%)	0.62 (0.42–0.92)	0.019
	Q3	458 (25%)	35 (18%)	0.41 (0.26–0.64)	<0.001
	Q4	457 (25%)	31 (16%)	0.40 (0.25–0.63)	<0.001
Component 2	Q1	458 (25%)	23 (12%)	Reference	
	Q2	457 (25%)	36 (19%)	1.45 (0.84–2.51)	0.181
	Q3	459 (25%)	65 (34%)	2.51 (1.52–4.15)	<0.001
	Q4	457 (25%)	67 (35%)	3.03 (1.83–5.02)	<0.001

ORs from logistic regression mixed analysis adjusted by age, sex, education, family history of gastric cancer, smoking status and province (random effects term), and mutually adjusted by principal component scores. GC: Gastric cancer. Q1: Lowest quartile; Q2: Second quartile; Q3: Third quartile; Q4: Highest quartile.

4. Discussion

In this study we have identified two patterns of antibody reactivity against 16 *H. pylori* proteins that are related to different risk of non-cardia gastric cancer: a pattern characterized by the concomitant presence of high antibody reactivities against a range of different proteins, which was associated with a lower risk, and another one characterized by high antibody reactivities against the main recognized *H. pylori* virulence factors, CagA and VacA, which was associated with a higher risk. Interestingly, in our control population these two patterns show some parallelism with the type of *H. pylori* strain causing the infection [29]. Those infected by a type I *H. pylori* strain (defined, following published criteria for

multiplex serology, by a seroreactivity against CagA higher than 9000 median reporter fluorescence intensity [26]) presented lower scores in the first component and higher scores in the second one than those infected by a type II strain (data not shown). Therefore, the first pattern could represent an *H. pylori* type II infection (“non-virulent pattern”) and the second one a type I infection (“virulent pattern”).

The analyses of serostatus of proteins individually showed that, after adjusting by main gastric cancer risk factors and by serostatus against significant proteins, seropositivity for CagA and seronegativity for CagI were associated with a higher risk of non-cardia gastric cancer. The dose-response analysis using quantitative values of the antibody reactivity showed a statistically significant



trend with intensity for both of them, giving some support for a real association (data not shown). CagA is a well-recognized *H. pylori* virulence factor that has been related to atrophic gastritis and non-cardia gastric cancer. On the other hand, the exact function of Cag $\delta$  is still not well understood [30]. This protein is a component of the T4SS (type 4 secretion system) of *H. pylori*. The major role of this T4SS is thought to be the translocation of the CagA effector protein into the host cell, but CagA-independent pathogenicity pathways, such as the induction of IL-8 production from the host, have also been suggested [31]. There is not consistency among the results from different studies in the possible role of serostatus to Cag $\delta$  as a marker of lower non-cardia gastric cancer risk [32–36]. Therefore, this finding should be taken cautiously until more evidence becomes available.

Recent studies using *H. pylori* multiplex serology have also found statistically significant inverse relations between seropositivity against some *H. pylori* proteins, such as CagM [36], GroEL and NapA [34], and gastric cancer risk, but others have not [32,33,35]. In a case-control study carried out in Sweden [33], a non-statistically significant lower risk of non-cardia gastric cancer was associated with seropositivity for the same four proteins identified in our study (UreA, HP231, NapA and Cag $\delta$ ) and to nine additional proteins (HP305, HpaA, CagM, VacA, HcpC, Cad, Omp, HomB and BabA), but only in the subgroup with serologic evidence of atrophic gastritis. In contrast, other studies have found higher gastric cancer risk associated with seropositivity for GroEL [32,33,35,36], HcpC [32,33,36], HP305 [32,35,36], Catalase [32,33], HyaA [32,33,35], Omp [33,35,36] or HpaA [33,35].

Some methodological differences among studies could help to explain the differences with our findings. First, statistical analyses performed to identify serological risk markers in our study have been restricted to subjects classified as infected (positive to 4 or more *H. pylori* proteins), in contrast to other studies, where the overall sample (infected and non-infected) was considered. However, we repeated our analyses in the overall sample, and not noteworthy differences appeared between the two approaches (data not shown). Second, differences in patient selection criteria, such as the exclusion of patients with atrophic gastritis [32], may lead to increased risk estimations. Third, the seroprevalence of *H. pylori* infection and of seropositivity for each protein differ among studies. High prevalences of exposure among controls, like in our sample, tend to reduce the magnitude of ORs in case-control studies [37,38]. Nevertheless, real differences among countries in the predominant bacterial strains and in host genetics and environmental factors cannot be ruled out as an explanation for different results among studies [39–41].

With respect to cardia gastric cancer, our results point to a lack of association with *H. pylori* seropositivity or to a decreasing risk. We have not a clear explanation for the estimated trend of decreasing cardia gastric cancer risk associated with a higher number of proteins recognized by serology. We have reasonably discarded the possibility of this finding being due to the effect of some confounding factor by adjusting for the main gastric cancer risk factors. Although not a complete agreement exists in the effect of *H. pylori* infection in the risk of esophageal adenocarcinoma, some studies have found a lower risk of this tumor associated with the infection [42], which would be concordant with our finding. Lastly, this association could be due to chance and therefore, replication in other studies would be necessary before accepting the number of seropositivities as a possible marker of decreased cardia gastric cancer risk.

Limitations of our study include the case-control design, which limits the possibility to demonstrate a cause to effect direction of the associations. Therefore, a possible impact on our results of changes in *H. pylori* serostatus secondary to the disease or its treatment cannot be completely ruled out. To explore the

possibility of reverse causation in our data, we performed stratified analyses by cancer stage and by treatment status at the moment of blood sample collection. No remarkable differences appeared in the estimated ORs between tumoral stage subgroups. Meanwhile, we observed some indications of a higher OR for the association between *H. pylori* seropositivity and non-cardia gastric cancer risk among those not having received cancer therapy, compared to those that had received some treatment (data not shown).

With regard to the criteria used to define infection (seropositivity for  $\geq 4$  proteins by multiplex serology), even though it has not been validated in our sample, it has shown acceptable validity when contrasted with standard ELISA and Western blot assays in other populations [26]. Nonetheless, the high sensitivity of the multiplex serology could minimize the impact that factors related to the persistence of the serological response, such as those mentioned, may have on the assessment of associations between infection diagnosed by serological techniques, and disease.

Strengths of our study comprise the inclusion of incident cases and of controls from the general population, as well as the acceptable sample size, including both, cardia and non-cardia gastric cancer cases. In addition, the study was conducted following a meticulous methodology that made possible gathering precise information for the most important recognized risk factors for gastric cancer. With respect to the multiplex serology, it allowed us to quantify antibody response against 16 *H. pylori* proteins, including the main virulence factors, in an important number of participants. One of the limitations usually attributed to studies using serological diagnosis to analyze the association between cancer and *H. pylori* infection is related to the persistence of the serological response in the presence of factors that can reduce it in a higher degree among cases, such as the clearance of the infection secondary to the development of atrophic gastritis or the immunodepression associated with cancer or its treatment. The high sensitivity of the multiplex serology could therefore minimize this limitation. Besides, estimating risks for the infected subjects instead of the whole sample, represents a novel approach that enriches previous knowledge, once the carcinogenic role of *H. pylori* in non-cardia gastric cancer has been generally accepted. This approach, applied to an *H. pylori* infection defined as seropositivity for four or more bacterial proteins, also contributes to reduce the possible classification error derived from eventual false positive results in serostatus against a single protein. Lastly, our results complement data derived from other regions, which is an important issue for a disease characterized by high geographical variations. The high seroprevalence of infection identified in this study does not have a reflection in the gastric cancer incidence or mortality rates in Spain, which are similar to the European average [2]. This could suggest that there are differences with respect to other populations either in the characteristics of the circulating *H. pylori* strains, in the host response to the infection or in environmental co-factors. Investigating whether the antibody reactivity patterns identified in this study are also present in other populations, and whether they are also associated with the risk of non-cardia gastric cancer, would be of value to contribute to the understanding of geographical differences.

## Conclusions

According to our results, people seropositive for *H. pylori* that have high antibody reactivities against CagA and VacA would have an increased risk of non-cardia gastric cancer, while those that have high concomitant seroreactivities against several *H. pylori* proteins, particularly against UreA, HP231, NapA, HyaA and Catalase would have a lower risk. Neither *H. pylori* overall seropositivity nor protein-specific seropositivity were associated with cardia gastric cancer risk.



### Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interests related to this work.

### Disclaimer

This article presents independent results. The views expressed are those of the authors and not necessarily those of the Instituto de Salud Carlos III.

### Authorship contribution

N. Aragonés, M. Pollán, G. Castaño-Vinyals, M. Kogevinas, B. Pérez-Gómez, V. Moreno, V. Martín, C. Navarro, S. de Sanjosé, B. Romero, R. del Campo, A. Michel, M. Pawlita conceptualized and designed the study.

N. Fernández de Larrea-Baz, B. Pérez-Gómez, N. Aragonés, A. Michel, B. Romero, M. Willhauck-Fleckenstein, R. del Campo, T. Waterboer, M. Pawlita developed the methodology.

N. Aragonés, B. Pérez-Gómez, V. Lope, T. Fernández-Villa, V. Moreno, V. Martín, M. Willhauck-Fleckenstein, J. Castilla, T. Dierssen-Sotos, R. Peiró, J.J. Jiménez-Moleón, C. Navarro, G. Castaño-Vinyals, M. Kogevinas, M. Pollán, S. de Sanjosé, B. Romero, R. del Campo, A. Michel, T. Waterboer, M. Pawlita participated in the acquisition of data.

N. Fernández de Larrea-Baz, B. Pérez-Gómez, A. Michel, B. Romero, V. Lope, T. Fernández-Villa, V. Moreno, V. Martín, G. López-Abente, J. Castilla, G. Fernandez-Tardón, T. Dierssen-Sotos, M. Santibáñez, R. Peiró, J.J. Jiménez-Moleón, C. Navarro, T. Waterboer, G. Castaño-Vinyals, M. Kogevinas, M. Pollán, S. de Sanjosé, R. del Campo, M. Pawlita, N. Aragonés analyzed and interpreted the data.

N. Fernández de Larrea-Baz, B. Pérez-Gómez, A. Michel, B. Romero, V. Lope, T. Fernández-Villa, V. Moreno, V. Martín, M. Willhauck-Fleckenstein, G. López-Abente, J. Castilla, G. Fernandez-Tardón, T. Dierssen-Sotos, M. Santibáñez, R. Peiró, J.J. Jiménez-Moleón, C. Navarro, T. Waterboer, G. Castaño-Vinyals, M. Kogevinas, M. Pollán, S. de Sanjosé, R. del Campo, M. Pawlita, N. Aragonés wrote and/or revised the manuscript.

N. Aragonés and M. Pawlita supervised the study.

### Acknowledgements

The authors thank the participants and staff of the collaborating hospitals and primary care centers for their valuable contributions as well as the other investigators of the Project MCC-Spain for their contributions to this study. They are also grateful to Adela Castelló and Roberto Pastor for their technical support in the principal components analysis, and to Soledad Alonso for her assistance in the classification of cases by histological type and tumor location. Also, the authors acknowledge the continuous support received from the CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP).

This study was partially funded by the “Acción Transversal del Cáncer”, approved on the Spanish Ministry Council on the 11th October 2007, by the CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), by the Instituto de Salud Carlos III grants, co-funded by FEDER funds –a way to build Europe– (grants PI08/1770, PI09/0773, PI09/1286, PI09/1903, PI09/2078, PI09/1662, PI11/01403), by the Fundación Marqués de Valdecilla (grant API 10/09), by Catalan Government DURSI (grants 2014SGR647 and 2014SGR756), by the Junta de Castilla y León (grant LE22A10-2), by the Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (grant 2009-S0143), and by the Conselleria de Sanitat of the Generalitat Valenciana (grant AP061/10). The funding institutions had no role in the study design, in the

collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report or in the decision to submit it for publication.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2017.08.002>.

### References

- [1] D. Forman, F. Bray, D.H. Brewster, C. Gombe Mbalawa, B. Kohler, M. Piñeros, E. Steliarova-Foucher, R. Swaminathan, J. Ferlay (Eds.), *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X* (electronic Version), International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 2013. <http://ci5.iarc.fr> (Accessed February 16, 2015).
- [2] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, F. Bray, GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2013. <http://globocan.iarc.fr> (Accessed October 9, 2015).
- [3] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J.W.W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012, *Eur. J. Cancer* 49 (2013) 1374–1403, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>.
- [4] Cancer and Environmental Epidemiology Unit, Interactive Epidemiological Information System (Ariadna), Carlos III Institute of Health, Madrid, 2015. <http://ariadna.cne.isciii.es/> (Accessed September 14, 2015).
- [5] Y. Verma, P.K. Pradhan, N. Gurung, S.D. Sapkota, P. Giri, P. Sundas, B.N. Bhattarai, D. Nadayil, T. Ramnath, A. Nandakumar, Population-based cancer incidence in Sikkim, India: report on ethnic variation, *Br. J. Cancer* 106 (2012) 962–965, doi: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2011.598>.
- [6] T.L. Ang, K.M. Fock, Clinical epidemiology of gastric cancer, *Singapore Med. J.* 55 (2014) 621–628.
- [7] P. Karimi, F. Islami, S. Anandasabapathy, N.D. Freedman, F. Kamangar, Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23 (2014) 700–713, doi: <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1057>.
- [8] E. García-Esquinas, B. Pérez-Gómez, M. Pollán, E. Boldo, P. Fernández-Navarro, V. Lope, E. Vidal, G. López-Abente, N. Aragonés, Gastric cancer mortality trends in Spain, 1976–2005, differences by autonomous region and sex, *BMC Cancer* 9 (2009) 346, doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-9-346>.
- [9] N. Aragonés, B. Pérez-Gómez, M. Pollán, R. Ramis, E. Vidal, V. Lope, J. García-Pérez, E. Boldo, G. López-Abente, The striking geographical pattern of gastric cancer mortality in Spain: environmental hypotheses revisited, *BMC Cancer* 9 (2009) 316, doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-9-316>.
- [10] N. Aragonés, T. Goicoa, M. Pollán, A.F. Militino, B. Pérez-Gómez, G. López-Abente, M.D. Ugarte, Spatio-temporal trends in gastric cancer mortality in Spain: 1975–2008, *Cancer Epidemiol.* 37 (2013) 360–369, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2013.03.009>.
- [11] G. López-Abente, N. Aragonés, B. Pérez-Gómez, M. Pollán, J. García-Pérez, R. Ramis, P. Fernández-Navarro, Time trends in municipal distribution patterns of cancer mortality in Spain, *BMC Cancer* 14 (2014) 535, doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-14-535>.
- [12] M. Plummer, C. de Martel, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, S. Franceschi, Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis, *Lancet Glob. Health* (N. Y.) 4 (2016) 609–616, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7).
- [13] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 1994.
- [14] M. Cavaleiro-Pinto, B. Peleteiro, N. Lunet, H. Barros, *Helicobacter pylori* infection and gastric cardia cancer: systematic review and meta-analysis, *Cancer Causes Control* 22 (2011) 375–387, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10552-010-9707-2>.
- [15] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, A Review of Human Carcinogens. Part B: Biological Agents, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon France, 2009.
- [16] L.M. Brown, *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission, *Epidemiol. Rev.* 22 (2000) 283–297.
- [17] L.H. Eusebi, R.M. Zagari, F. Bazzoli, Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter* 19 (2014) 1–5, doi: <http://dx.doi.org/10.1111/hel.12165>.
- [18] B. Peleteiro, A. Bastos, A. Ferro, N. Lunet, Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage, *Dig. Dis. Sci.* 59 (2014) 1698–1709, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-014-3063-0>.
- [19] J. Bastos, B. Peleteiro, R. Barros, L. Alves, M. Severo, M. de Fátima Pina, H. Pinto, S. Carvalho, A. Marinho, J.T. Guimarães, A. Azevedo, C. La Vecchia, H. Barros, N. Lunet, Sociodemographic determinants of prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in Portuguese adults, *Helicobacter* 18 (2013) 413–422, doi: <http://dx.doi.org/10.1111/hel.12061>.
- [20] F. Sánchez Ceballos, C. Taxonera Samsó, C. García Alonso, C. Alba López, L. Sainz de Los Terreros Soler and M. Díaz-Rubio, [Prevalence of *Helicobacter pylori*



- infection in the healthy population of Madrid (Spain)], *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 99 (2007) 497–501.
- [21] R. Macenlle García, P. Gayoso Diz, R.A. Sueiro Benavides, J. Fernández Seara, Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the general adult population of the province of Ourense, *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 98 (2006) 241–248.
  - [22] J.G. Kusters, A.H.M. van Vliet, E.J. Kuipers, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 449–490, doi:http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00054-05.
  - [23] D.N. Sgouras, T.T.H. Trang, Y. Yamaoka, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter* 20 (2015) 8–16, doi:http://dx.doi.org/10.1111/hel.12251.
  - [24] L.E. Wroblewski, R.M. Peek, K.T. Wilson, *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk, *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (2010) 713–739, doi:http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00011-10.
  - [25] W. Zhang, H. Lu, D.Y. Graham, An update on *Helicobacter pylori* as the cause of gastric cancer, *Gastrointest. Tumors* 1 (2014) 155–165, doi:http://dx.doi.org/10.1159/000365310.
  - [26] A. Michel, T. Waterboer, M. Kist, M. Pawlita, *Helicobacter pylori* multiplex serology, *Helicobacter* 14 (2009) 525–535, doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-5378.2009.00723.x.
  - [27] G. Castaño-Vinyals, N. Aragonés, B. Pérez-Gómez, V. Martín, J. Llorca, V. Moreno, J.M. Altzibar, E. Ardanaz, S. de Sanjosé, J.J. Jiménez-Moleón, A. Tardón, J. Alguacil, R. Peiró, R. Marcos-Gragera, C. Navarro, M. Pollán, M. Kogevinas, MCC-Spain Study Group, Population-based multicase-control study in common tumors in Spain (MCC-Spain): rationale and study design, *Gac. Sanit.* 29 (2015) 308–315, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.gaceta.2014.12.003.
  - [28] T. Waterboer, P. Sehr, K.M. Michael, S. Franceschi, J.D. Nieland, T.O. Joos, M.F. Templin, M. Pawlita, Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione S-transferase fusion proteins, *Clin. Chem.* 51 (2005) 1845–1853, doi:http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.052381.
  - [29] Z. Xiang, S. Censini, P.F. Bayeli, J.L. Telford, N. Figura, R. Rappuoli, A. Covacci, Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin, *Infect. Immun.* 63 (1995) 94–98.
  - [30] P. Olbermann, C. Josenhans, Y. Moodley, M. Uhr, C. Stamer, M. Vauterin, S. Suerbaum, M. Achtman, B. Linz, A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island, *PLoS Genet.* 6 (2010) e1001069, doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001069.
  - [31] G. Zanotti, L. Cendron, Structural and functional aspects of the *Helicobacter pylori* secretome, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 1402–1423, doi:http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20i6.1402.
  - [32] L. Gao, A. Michel, M.N. Weck, V. Amdt, M. Pawlita, H. Brenner, *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk: evaluation of 15 *H. pylori* proteins determined by novel multiplex serology, *Cancer Res.* 69 (2009) 6164–6170, doi:http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0596.
  - [33] H. Song, A. Michel, O. Nyrén, A.-M. Ekström, M. Pawlita, W. Ye, A CagA-independent cluster of antigens related to the risk of noncardia gastric cancer: associations between *Helicobacter pylori* antibodies and gastric adenocarcinoma explored by multiplex serology, *Int. J. Cancer* 134 (2014) 2942–2950, doi:http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28621.
  - [34] R. Shakeri, R. Malekzadeh, D. Nasrollahzadeh, M. Pawlita, G. Murphy, F. Islami, M. Sotoudeh, A. Michel, A. Etemadi, T. Waterboer, H. Poustchi, P. Brennan, P. Boffetta, S.M. Dawsey, F. Kamangar, C.C. Abnet, Multiplex *H. pylori* serology and risk of gastric cardia and non-cardia adenocarcinomas, *Cancer Res.* 75 (2015) 4876–4883, doi:http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0556.
  - [35] M. Epplein, W. Zheng, Y.-B. Xiang, R.M. Peek, H. Li, P. Correa, J. Gao, A. Michel, M. Pawlita, Q. Cai, X.-O. Shu, Prospective study of *Helicobacter pylori* biomarkers for gastric cancer risk among Chinese men, *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 21 (2012) 2185–2192, doi:http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0792-T.
  - [36] G. Murphy, N.D. Freedman, A. Michel, J.-H. Fan, P.R. Taylor, M. Pawlita, Y.-L. Qiao, H. Zhang, K. Yu, C.C. Abnet, S.M. Dawsey, Prospective study of *Helicobacter pylori* antigens and gastric noncardia cancer risk in the nutrition intervention trial cohort, *Int. J. Cancer* 137 (2015) 1938–1946, doi:http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29543.
  - [37] J.Q. Huang, S. Sridhar, Y. Chen, R.H. Hunt, Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer, *Gastroenterology* 114 (1998) 1169–1179.
  - [38] M. Vrijheid, I. Deltour, D. Krewski, M. Sanchez, E. Cardis, The effects of recall errors and of selection bias in epidemiologic studies of mobile phone use and cancer risk, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 16 (2006) 371–384, doi:http://dx.doi.org/10.1038/sj.jes.7500509.
  - [39] Y. Yamaoka, M. Kato, M. Asaka, Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains, *Intern. Med.* 47 (2008) 1077–1083.
  - [40] J. Kang, K.R. Jones, S. Jang, C.H. Olsen, Y.-J. Yoo, D.S. Merrell, J.-H. Cha, The geographic origin of *Helicobacter pylori* influences the association of the homB gene with gastric cancer, *J. Clin. Microbiol.* 50 (2012) 1082–1085, doi:http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06293-11.
  - [41] M. Sugimoto, Y. Yamaoka, The association of vacA genotype and *Helicobacter pylori*-related disease in Latin American and African populations, *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (2009) 835–842, doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02769.x.
  - [42] S. Nie, T. Chen, X. Yang, P. Huai, M. Lu, Association of *Helicobacter pylori* infection with esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: a meta-analysis, *Dis. Esophagus* 27 (2014) 645–653, doi:http://dx.doi.org/10.1111/dote.12194.

Supplementary Table S1

*H. pylori* proteins analyzed and cut-offs used for serostatus classification

Short name	Full name	ORF no.	Cut-off (MFI)
GroEL	Chaperonin GroEL	HP10	100
UreA	Urease alfa subunit	HP73	661
HP231	Hypothetical protein	HP231	100
NapA	Neutrophil activating protein (bacterioferritin)	HP243	100
HP305	Hypothetical protein	HP305	100
HpaA	Neuraminylactose-binding hemagglutinin homolog	HP410	246
Cag $\delta$	<i>cag</i> pathogenicity island protein $\delta$	HP522	717
CagM	<i>cag</i> pathogenicity island protein M	HP537	100
CagA	Cytotoxin-associated antigen A	HP547	3338
HyuA	Hydantoin utilization protein A	HP695	260
Catalase	Catalase	HP875	976
VacA	Vacuolating cytotoxin	HP887	570
HcpC	Conserved hypothetical secreted protein - paralogue HcpA	HP1098	100
Cad	Cinnamyl-alcohol dehydrogenase ELI3-2	HP1104	140
Omp	Outer membrane protein	HP1564	809
HomB	Hp outer membrane protein B	-	525

All the proteins were expressed from *H. pylori* strain 26695, except GroEL, from strain G27 and HomB from strain J99. Criteria for choosing proteins for the assay were: known surface exposure and immunogenicity in two-dimensional immunoblot analyses (UreA, HP231, NapA, HpaA, CagA, Catalase and VacA), serologic association with gastric cancer (GroEL, HyuA, Cad, HcpC and Omp) and/or with gastric ulcer (HP305 and CagM), and specific recognition in *H. pylori*-positive sera (Cag $\delta$  and CagM).

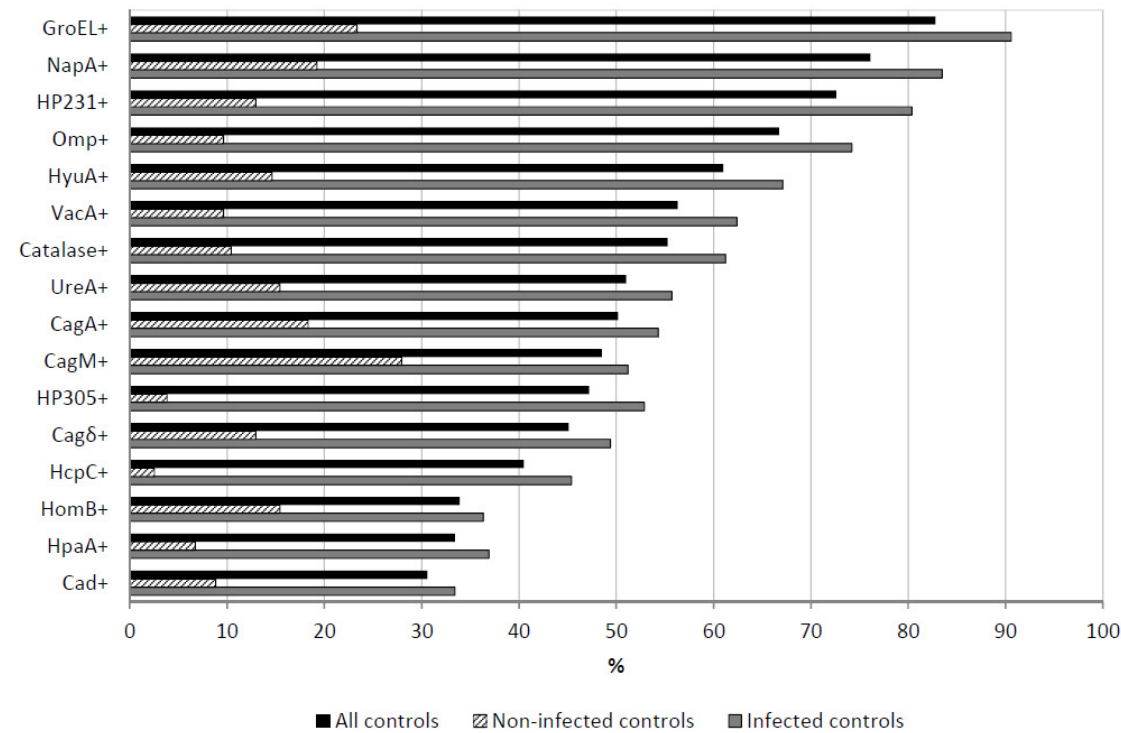
MFI: Median reporter Fluorescence Intensity.

**Supplementary Table S2****Component loadings for the two selected principal components**

<i>H. pylori</i> protein	Component 1	Component 2
GroEL	0.3814	0.0727
UreA	0.3632	-0.1030
HP231	0.3073	-0.0621
NapA	0.3803	-0.2034
HP305	0.2334	0.0651
HpaA	0.1428	0.1349
Cag $\delta$	0.1179	0.2400
CagM	-0.0129	0.3187
CagA	-0.0774	0.5866
HyuA	0.3351	0.0337
Catalase	0.3179	-0.0666
VacA	0.0346	0.5586
HcpC	0.2420	0.0546
Cad	0.1787	-0.0404
Omp	0.2819	0.2304
HomB	0.0642	0.1946



Supplementary Figure S1



Seropositivity for each *H. pylori* protein in controls, according to their status of infection: All controls, non-infected (no seropositive to more than 3 *H. pylori* proteins) and infected (seropositive to 4 or more *H. pylori* proteins) controls.

## Artículo 2

### ***Helicobacter pylori* antibody reactivities and colorectal cancer risk in a case-control study in Spain**

Copyright © 2017 Fernández de Larrea-Baz, Michel, Romero, Pérez-Gómez, Moreno, Martín, Dierssen-Sotos, Jiménez-Moleón, Castilla, Tardón, Ruiz, Peiró, Tejada, Chirlaque, Butt, Olmedo-Requena, Gómez-Acebo, Linares, Boldo, Castells, Pawlita, Castaño-Vinyals, Kogevinas, de Sanjosé, Pollán, del Campo, Waterboer and Aragonés. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY).

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00888>

#### Resumen

#### **Reactividad de anticuerpos frente a *Helicobacter pylori* y riesgo de cáncer colorrectal en un estudio de casos y controles en España**

**Antecedentes:** algunos estudios han sugerido que la infección por *Helicobacter pylori* es un factor de riesgo de cáncer colorrectal, mientras que otros no han confirmado esta hipótesis.

**Objetivo:** evaluar la relación del cáncer colorrectal con la seropositividad global frente a *H. pylori* y frente a 16 proteínas concretas de *H. pylori* en el estudio MCC-Spain.

**Metodología:** MCC-Spain es un estudio multicaso-control llevado a cabo en España entre 2008 y 2013. En total se reclutaron 2140 casos incidentes de cáncer colorrectal confirmados histológicamente y 4098 controles de base poblacional. Los controles se aparearon por frecuencia con la distribución de edad y sexo de todos los casos reclutados en cada provincia. La información epidemiológica se recogió mediante un cuestionario cumplimentado en una entrevista personal y mediante un cuestionario de frecuencia de alimentos autoadministrado. La serorreactividad frente a las 16 proteínas de *H. pylori* se determinó en 1488 casos y 2495 controles mediante serología múltiple para *H. pylori*. La seropositividad global frente a *H. pylori* se definió como seropositividad frente a cuatro o más proteínas. Se utilizaron modelos mixtos de regresión logística multivariable para estimar las odds ratios (OR) y los intervalos de confianza al 95% (IC).

**Resultados:** la seropositividad frente a *H. pylori* no se asoció con un riesgo mayor de cáncer colorrectal (OR=0,91 [IC 95%: 0,71–1,16]). Entre los participantes seropositivos frente a *H. pylori*, la seropositividad frente a la proteína Cagδ se asoció con un riesgo menor de cáncer colorrectal, y el riesgo de cáncer disminuyó a medida que el número de proteínas seropositivas aumentaba. La

---

seropositividad frente a los factores de virulencia más ampliamente reconocidos, CagA y VacA, no se asoció con un riesgo mayor de cáncer colorrectal. No se observó heterogeneidad estadísticamente significativa en los resultados en función de la localización tumoral, aunque las asociaciones inversas fueron de mayor magnitud para los tumores de colon izquierdo. Se identificó una interacción con la edad y el sexo: la seropositividad frente a *H. pylori* se asoció con un riesgo menor de cáncer colorrectal en hombres menores de 65 años, y con un riesgo mayor en mujeres mayores de esa edad.

**Conclusiones:** los resultados sugieren que ni la seropositividad global frente a *H. pylori* ni la seropositividad frente al factor de virulencia CagA se asocian con un riesgo mayor de cáncer colorrectal. Se identificó una posible modificación del efecto en función de la edad y el sexo.



# *Helicobacter pylori* Antibody Reactivities and Colorectal Cancer Risk in a Case-control Study in Spain

Nerea Fernández de Larrea-Baz<sup>1,2\*</sup>, Angelika Michel<sup>3</sup>, Beatriz Romero<sup>4</sup>, Beatriz Pérez-Gómez<sup>1,2,5</sup>, Víctor Moreno<sup>2,6,7,8</sup>, Vicente Martín<sup>2,9,10</sup>, Trinidad Dierssen-Sotos<sup>2,11</sup>, José J. Jiménez-Moleón<sup>2,12,13</sup>, Jesús Castilla<sup>2,14</sup>, Adonina Tardón<sup>2,15</sup>, Iruñe Ruiz<sup>16</sup>, Rosana Peiró<sup>2,17</sup>, Antonio Tejada<sup>18</sup>, María D. Chirlaque<sup>2,19,20</sup>, Julia A. Butt<sup>3</sup>, Rocio Olmedo-Requena<sup>2,12,13</sup>, Inés Gómez-Acebo<sup>2,11</sup>, Pedro Linares<sup>21</sup>, Elena Boldo<sup>1,2,5</sup>, Antoni Castells<sup>22,23,24,25</sup>, Michael Pawlita<sup>3</sup>, Gemma Castaño-Vinyals<sup>2,26,27,28</sup>, Manolis Kogevinas<sup>2,26,27,28</sup>, Silvia de Sanjosé<sup>2,29</sup>, Marina Pollán<sup>1,2,5</sup>, Rosa del Campo<sup>4,30</sup>, Tim Waterboer<sup>3</sup> and Nuria Aragonés<sup>1,2</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Thomas Dandekar,  
University of Würzburg, Germany

### Reviewed by:

Pallab Ghosh,  
Harvard Medical School,  
United States  
Michele Barone,  
Università Degli Studi di Bari Aldo  
Moro, Italy

### \*Correspondence:

Nerea Fernández de Larrea-Baz  
nfernandez@extermos.isciii.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Infectious Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 30 December 2016

**Accepted:** 02 May 2017

**Published:** 29 May 2017

### Citation:

Fernández de Larrea-Baz N, Michel A, Romero B, Pérez-Gómez B, Moreno V, Martín V, Dierssen-Sotos T, Jiménez-Moleón JJ, Castilla J, Tardón A, Ruiz I, Peiró R, Tejada A, Chirlaque MD, Butt JA, Olmedo-Requena R, Gómez-Acebo I, Linares P, Boldo E, Castells A, Pawlita M, Castaño-Vinyals G, Kogevinas M, de Sanjosé S, Pollán M, del Campo R, Waterboer T and Aragonés N (2017) *Helicobacter pylori* Antibody Reactivities and Colorectal Cancer Risk in a Case-control Study in Spain. *Front. Microbiol.* 8:888. doi: 10.3389/fmicb.2017.00888

<sup>1</sup> Environmental and Cancer Epidemiology Area, National Center of Epidemiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>2</sup> Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBER of Epidemiology and Public Health) – Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain, <sup>3</sup> Division of Molecular Diagnostics of Oncogenic Infections, Infection, Inflammation and Cancer Program, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany, <sup>4</sup> Department of Microbiology, Ramón y Cajal University Hospital (IRYCIS), Madrid, Spain, <sup>5</sup> Cancer Epidemiology Research Group, Oncology and Hematology Area, IIS Puerta de Hierro (Puerta de Hierro Health Research Institute), Madrid, Spain, <sup>6</sup> Cancer Prevention and Control Program, Catalan Institute of Oncology, Hospitalet de Llobregat, Spain, <sup>7</sup> Department of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>8</sup> Colorectal Cancer Group, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Spain, <sup>9</sup> The Research Group in Gene – Environment and Health Interactions, University of León, León, Spain, <sup>10</sup> Area of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Health Sciences, Department of Biomedical Sciences, University of León, León, Spain, <sup>11</sup> Division of Epidemiology and Computational Biology, School of Medicine, University of Cantabria-IDIVAL, Santander, Spain, <sup>12</sup> Granada Health Research Institute (Ibs.GRANADA) – Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Granada, Spain, <sup>13</sup> Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Granada, Granada, Spain, <sup>14</sup> Instituto de Salud Pública de Navarra, IdiSNA-Navarra Institute for Health Research, Pamplona, Spain, <sup>15</sup> Molecular Epidemiology of Cancer Unit, Oncology Institute, Department of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain, <sup>16</sup> Department of Pathology, Donostia University Hospital, Donostia, Spain, <sup>17</sup> Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research of Valencia Region (FISABIO) – Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana FISABIO-Salud Pública, Valencia, Spain, <sup>18</sup> Coloproctology Unit, Department of General Surgery, Huelva University Hospital Complex, Huelva, Spain, <sup>19</sup> Department of Epidemiology, Regional Health Council, IMIB-Arrixaca, Murcia, Spain, <sup>20</sup> Department of Health and Social Sciences, University of Murcia, Murcia, Spain, <sup>21</sup> Department of Gastroenterology and Hepatology, Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain, <sup>22</sup> Gastroenterology Department, Hospital Clinic, Barcelona, Spain, <sup>23</sup> Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, <sup>24</sup> CIBER Liver and Digestive Diseases – CIBER Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid, Spain, <sup>25</sup> Department of Gastroenterology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, <sup>26</sup> ISGlobal, Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain, <sup>27</sup> Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain, <sup>28</sup> Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain, <sup>29</sup> Cancer Epidemiology and Research Program, Catalan Institute of Oncology-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain, <sup>30</sup> Spanish Network for Research in Infectious Diseases – Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, Sevilla, Spain

**Background:** Several studies have suggested that *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is a risk factor for colorectal cancer (CRC), while others have not confirmed this hypothesis. This work aimed to assess the relation of CRC with *H. pylori* seropositivity and with seropositivity to 16 *H. pylori* proteins, in the MultiCase-Control study, MCC-Spain.

**Methods:** MCC-Spain is a multicase-control study carried out in Spain from 2008 to 2013. In total, 2,140 histologically-confirmed incident CRC cases and 4,098 population-based controls were recruited. Controls were frequency-matched by sex, age, and province. Epidemiological data were collected through a questionnaire

fulfilled by face-to-face interviews and a self-administered food-frequency questionnaire. Seroreactivities against 16 *H. pylori* proteins were determined in 1,488 cases and 2,495 controls using *H. pylori* multiplex serology. *H. pylori* seropositivity was defined as positivity to  $\geq 4$  proteins. Multivariable logistic regression mixed models were used to estimate odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI).

**Results:** *H. pylori* seropositivity was not associated with increased CRC risk (OR = 0.91; 95% CI: 0.71–1.16). Among *H. pylori* seropositive subjects, seropositivity to Cag $\delta$  showed a lower CRC risk, and risk decreased with increasing number of proteins seropositive. Seropositivity to the most recognized virulence factors, CagA and VacA, was not associated with a higher CRC risk. No statistically significant heterogeneity was identified among tumor sites, although inverse relations were stronger for left colon cancer. An interaction with age and sex was found: *H. pylori* seropositivity was associated with a lower CRC risk in men younger than 65 and with a higher risk in older women.

**Conclusions:** Our results suggest that neither *H. pylori* seropositivity, nor seropositivity to the virulence factor CagA are associated with a higher CRC risk. A possible effect modification by age and sex was identified.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, multiplex serology, colorectal neoplasm, chronic infection, bacterial infections, non-infectious diseases

## INTRODUCTION

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is the *Helicobacter* species that predominantly infects humans. According to the usual site of colonization, *Helicobacter* species can be divided into gastric and enteric or enterohepatic *Helicobacter* types (International Agency for Research on Cancer, 2012). Though most literature on the implication of *H. pylori* in the etiopathogenesis of cancer refers to gastric cancer [adenocarcinoma and low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) gastric lymphoma], there are also studies investigating its role in cancer of other organs of the digestive system, including esophagus, colon and rectum, pancreas, and biliary tract (Siddheshwar et al., 2001; Trikudanathan et al., 2011; Sonnenberg and Genta, 2013; Xiao et al., 2013; Murphy et al., 2014; Wang et al., 2014; Chen et al., 2015), and even of extra-digestive organs, such as lung or larynx (Rezaei et al., 2008; Mounika, 2013).

Regarding a possible association between *H. pylori* infection and colorectal cancer (CRC) risk, there are no consistent results in the scientific literature. Several meta-analyses (Zumkeller et al., 2006; Zhao et al., 2008; Hong et al., 2012; Chen et al., 2013; Rokkas et al., 2013; Wu et al., 2013; Guo and Li, 2014; Liu and Zheng, 2016) have obtained combined odds ratios (OR) over the unity (range from 1.08 to 1.63), suggesting an increased CRC risk associated with *H. pylori* infection. However, heterogeneity among studies and insufficient control for confounding factors in most of them entail a high degree of uncertainty, which precludes from deriving solid conclusions. Biological plausibility has been investigated and several mechanisms have been proposed to explain an increased risk of CRC due to *H. pylori* infection. The most established involve the increase of gastrin secretion, the modification of gut microbiota and the chronic inflammation status (Chang and Parsonnet, 2010; Tatishchev et al., 2012;

Papastergiou, 2016). However, two recent publications, one reporting results from a nested case-control study including a Caucasian population from the US (Blase et al., 2016) and another from a cohort study in Germany (Chen et al., 2016), not included in the above mentioned meta-analyses, did not find a statistically significant association between *H. pylori* infection and CRC.

The pathogenicity of different *H. pylori* strains colonizing the gastric mucosa has been involved in modulating the risk of gastric adenocarcinoma. Whether such an effect also exists for CRC has been studied to a lesser extent, but could be one of the factors contributing to heterogeneity among the studies' results. *H. pylori* multiplex serology is a recently developed technique able to quantify seroreactivity against several *H. pylori* proteins in a wide set of serum samples in a single assay. It therefore allows obtaining a detailed characterization of the serological response against *H. pylori*, as a surrogate marker of differences in bacterial protein expression patterns, in large population samples.

The aims of this study are to evaluate the association between *H. pylori* seropositivity as well as seropositivity against 16 individual *H. pylori* proteins and CRC risk. CRC cases and controls of the MCC-Spain study were examined, controlling for the main potential confounding factors and exploring differences among cancer sites, age groups, and sex.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

We used data from the participants in the MCC-Spain multicase-control project, a large multicenter study with population-based controls. This study aimed to investigate environmental and genetic factors involved in the etiology of various forms of cancer. Following a standardized protocol, patients with a new diagnosis



of gastric, colorectal, breast, or prostate cancer, and chronic lymphocytic leukemia cases, aged 20–85 years, were invited to participate in 23 hospitals from 12 Spanish geographical regions (provinces). All cases had lived in the catchment area of each hospital for at least 6 months prior to diagnosis. Each province recruited at least two different cancer types. In parallel, a single group of population-based controls was randomly selected from the general population living in the catchment areas of the collaborating hospitals, frequency-matched for age and sex to the whole set of cases included in each province. Recruitment started in September 2008 and lasted until December 2013, though the period of recruitment differed by hospital. Of the 23 hospitals, 18 from 11 Spanish provinces recruited CRC cases: Asturias, Barcelona, Cantabria, Gipuzkoa, Granada, Huelva, León, Madrid, Murcia, Navarra, and Valencia. The Ethical Review Board of each participating center approved the study protocol. All participants provided written informed consent for their enrolment in the study. More details regarding the design of the study are provided elsewhere (Castaño-Vinyals et al., 2015).

## Data Collection

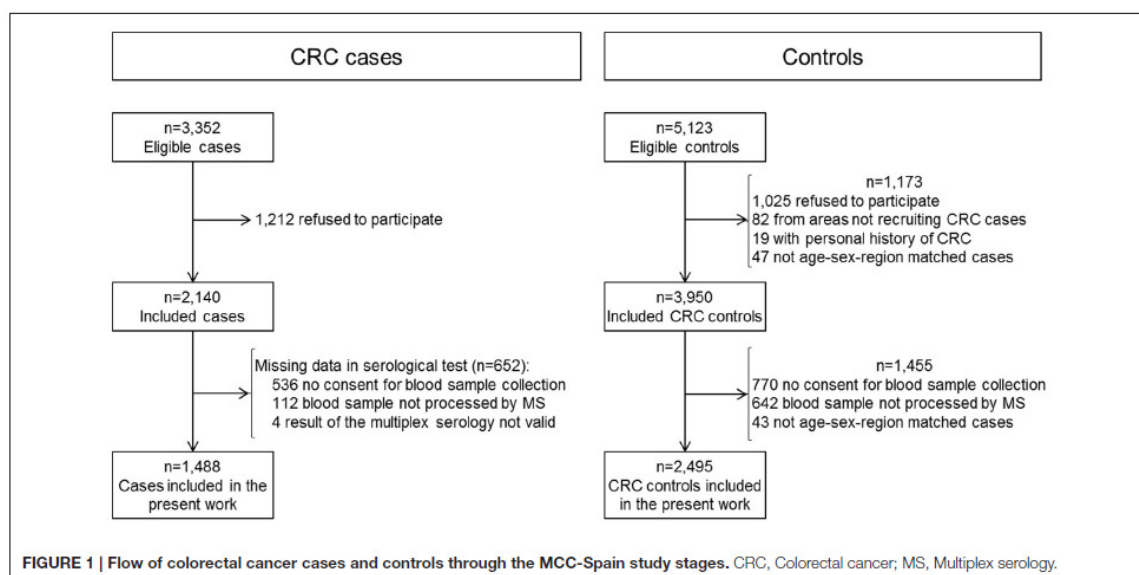
Experienced interviewers conducted structured interviews to cases and controls, to collect information on socio-demographic factors, life-styles, weight and height at various periods of life, occupational history, medical history, and family history of cancer. Dietary habits were obtained through a food-frequency questionnaire provided to each participant at the interview for self-fulfillment and returned by mail. Following the study protocol, all cases and controls were asked to donate a blood sample. Specimens were refrigerated locally until being processed and aliquoted (in <48 h). Then, they were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until they were sent to the laboratory.

In total, 2,140 histopathologically confirmed CRC cases and 3,950 controls were included. The analysis presented here is based on 1,488 (70%) CRC cases and 2,495 (63%) controls. Main reasons for not being included in the analysis were not having donated a blood sample and sample not having been processed by multiplex serology (Figure 1).

## Laboratory Assays

Seroreactivities against 16 *H. pylori* proteins were determined using *H. pylori* multiplex serology (Supplementary Table 1). Multiplex serology is a glutathione S-transferase (GST) capture immunosorbent assay combined with fluorescent-bead technology, as described elsewhere (Waterboer et al., 2005). This technique simultaneously quantifies antibodies directed against an array of antigens. In brief, bacterially expressed recombinant GST-*H. pylori* fusion proteins were used as antigens. The fusion proteins were loaded and affinity-purified directly on individual sets of spectrally distinct glutathione-casein-coupled fluorescence-labeled polystyrene beads (SeroMap, Luminex, Austin, TX). Bead sorts, each carrying a different antigen, were mixed and incubated with human sera at 1:100 dilutions. Antibodies bound to the beads via the bacterial antigens were stained by biotinylated anti-human-IgA, IgM, IgG (Dianova, Hamburg, Germany), and streptavidin-R-phycoerythrin. Beads were examined in a Luminex 200 analyzer that quantifies the antibody bound to bacterial antigen via the median R-phycoerythrin fluorescence intensity of at least 100 beads of the same internal color. Net (bead and GST background subtracted) median reporter fluorescence intensity (MFI)-values were calculated and negative values were set to +1.

For *H. pylori* proteins, serostatus cut-offs were calculated (mean MFI + 3 SD, excluding positive outliers) in 17 *H. pylori* negative sera previously classified for *H. pylori* status run within



the same experiment. According to these cut-offs (Supplementary Table 1), each participant was classified as seropositive or seronegative to each protein. Following previously published criteria, *H. pylori* seropositivity was defined as positivity for at least four of the 15 *H. pylori* proteins (excluding HomB, a protein recently added to *H. pylori* multiplex serology). Subjects fulfilling this criterion were considered infected (Michel et al., 2009).

## Statistical Analysis

Cases and controls characteristics were summarized by frequencies and percentages for categorical variables, and by means and standard deviations for continuous variables. To test for possible differences among cases and controls, and among infected and non-infected controls in the distribution of potential confounding factors, univariate (chi-squared or Mann-Whitney U-test for categorical and continuous variables, respectively) and multivariable (logistic regression) analyses were done.

Multivariable logistic regression mixed models were used to quantify the association between *H. pylori* seropositivity and CRC risk, estimating ORs and their 95% confidence intervals (CI). First a basic model (model 1) was built, that was adjusted for gender, age (as a continuous variable), and education. Secondly, a model including potential confounders such as smoking status, body mass index (BMI), and family history of CRC was developed (model 2). Lastly a fully adjusted model was done (model 3), that was additionally adjusted by ethanol intake at age 30–40 (g/day) and dietary factors: total energy intake (calories/day), vegetables intake (g/day), and red and processed meat intake (g/day). In all models province was included as a random-effect term.

Among *H. pylori* positive cases and controls, the association between serostatus against each of the 16 proteins and CRC risk was then investigated. Multivariable logistic regression mixed models were used, adjusting by gender, age, education level, smoking status, and CRC family history. As a sensitivity analysis, models additionally adjusted by BMI, ethanol intake at age 30–40 and dietary factors were constructed. Province was included as a random-effect term.

For those proteins whose serostatus resulted independently associated with CRC risk, dose-response relation was assessed by analyzing the association between seroreactivity and CRC risk. Seroreactivity was categorized in tertiles, based on the distribution of the MFI for each protein in infected controls seropositive against that protein.

A possible differential effect by tumor site was analyzed. For this purpose, multinomial logistic regression mixed models were fitted. Heterogeneity of the effects was assessed using a Wald-test comparing the coefficients obtained for the different CRC sites. Tumors located in cecum, ascending colon, hepatic flexure or transverse colon were grouped as right colon cancer, those located in the splenic flexure, descending colon or sigmoid, as left colon and tumors classified as rectosigmoidal were grouped with rectum cancer cases.

To assess the association of seropositivity against each protein independent of serostatus of other proteins, a multivariable logistic regression mixed analysis was carried out simultaneously including all the proteins associated with colorectal, colon, or

rectum cancer with a  $p < 0.10$  in the individual analyses also adjusting by gender, age, education, smoking status, and CRC family history.

Effect modification by age, sex, and education was explored by comparing models with and without the interaction term and assessed through the likelihood-ratio test. Age was dichotomized using as cut-off value the median of the age in controls. Stratified analyses were performed where interaction was present.

The raw data analyzed for the current study are not publicly available due to confidentiality related restrictions, but they would be available from the last author or from one of the co-principal investigators on reasonable request [Dr. N. Aragonés (naraiones@isciii.es)/Dr. M. Pollán (mpollan@isciii.es)].

## RESULTS

Cases of CRC were predominantly men (64%), had a mean age of 67 years (SD: 11) and a low education (72% primary school or lower). Controls were, on average, 3 years younger, with lower history of CRC among their first-degree relatives and had a higher education level (Table 1). With respect to differences in dietary habits, controls had higher intake of vegetables, nuts and smoked foods, lower intake of red and processed meat, and lower overall energy intake. Clinico-pathological characteristics of cases are summarized in Supplementary Table 2. Tumor was located in the colon in 910 cases [402 (27%) right colon, 507 (34%) left colon, and 1 not specified], and in the rectum in 556 cases (37%). For 22 cases (1.5%) colon or rectum location could not be classified. Most tumors were adenocarcinomas (97%).

Overall, *H. pylori* seropositivity was 88% (95% CI: 86–89) in controls and 90% (95% CI: 88–91) in CRC cases, with no differences by tumor anatomic site. Distribution of potential confounding factors by *H. pylori* serostatus in controls is presented in Supplementary Table 3. Among factors associated with the case/control status in the univariable analysis in our sample, sex, age, education, BMI, alcohol consumption, and intakes of vegetables and nuts appeared associated also with the exposure to *H. pylori* infection in controls. However, after mutually adjusting by factors with a  $p < 0.10$  in the univariable analysis, only sex and intake of vegetables were associated with *H. pylori* serostatus using a  $p$ -value limit of 0.05 (data not shown).

In Table 2 seroprevalence for each *H. pylori* protein among infected controls and cases can be seen. The highest prevalences were detected for GroEL, NapA, HP231, and Omp, and the lowest for HpaA, HomB, and Cad. Infected to non-infected seropositivity ratio were highest for HcpC (20 in controls and 32 in cases) and lowest for HomB (two both, in controls and cases).

As shown in Table 3, in the multivariable analysis *H. pylori* seropositivity was not statistically significantly associated with a higher CRC risk, neither in the basal model, nor in models adjusted by different sets of covariates. An inverse relation between the number of proteins with seroreactivity above the corresponding cut-off level and CRC risk emerged when adjusting by BMI and/or diet and alcohol consumption variables. CRC risk was 5% lower for each additional seropositive protein. By tumor site, *H. pylori* infection tended to be associated with a

TABLE 1 | Characteristics of colorectal cancer cases and controls.

Variable	Controls (N = 2,495)	Cases <sup>a</sup>					
		All (N = 1,488)		Colon (N = 910)		Rectum (N = 556)	
	N (%)	N (%)	p-values	N (%)	p-values	N (%)	p-values
Sex			<0.001		<0.001		<0.001
Male	1,275 (51)	945 (64)		552 (61)		376 (68)	
Female	1,220 (49)	543 (36)		358 (39)		180 (32)	
Age (years) <sup>b</sup>	63.6 [11.7]	66.7 [10.6]	<0.001	67.3 [10.6]	<0.001	65.8 [10.6]	<0.001
Race			0.521		0.510		0.192
White/Caucasian	2,451 (98)	1,465 (98)		891 (98)		552 (99)	
Other	42 (2)	23 (2)		19 (2)		4 (1)	
Missing	2 (0)	0 (0)		0 (0)		0 (0)	
Education			<0.001		<0.001		<0.001
No/incomplete primary school	482 (19)	471 (32)		291 (32)		176 (32)	
Primary school	891 (36)	589 (40)		356 (39)		224 (40)	
Secondary school	685 (27)	284 (19)		169 (19)		109 (20)	
University degree	437 (18)	144 (10)		94 (10)		47 (8)	
Smoking status			0.013		0.039		0.023
Never smoker	1,099 (44)	612 (41)		398 (44)		208 (37)	
Former smoker	854 (34)	577 (39)		345 (38)		223 (40)	
Current smoker	533 (21)	289 (19)		161 (18)		122 (22)	
Missing	9 (0)	10 (1)		6 (1)		3 (1)	
Past ethanol intake <sup>c</sup>			<0.001		0.003		0.029
No drinker	611 (24)	377 (25)		235 (26)		136 (24)	
Light	455 (18)	205 (14)		127 (14)		77 (14)	
Upper recommended limit	505 (20)	280 (19)		162 (18)		113 (20)	
Abundant	440 (18)	285 (19)		166 (18)		114 (21)	
Heavy/Very heavy	205 (8)	166 (11)		101 (11)		62 (11)	
Missing	279 (11)	175 (12)		119 (13)		54 (10)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )			<0.001		<0.001		0.008
<25	788 (32)	331 (22)		183 (20)		142 (26)	
25–29.9	930 (37)	540 (36)		324 (36)		211 (38)	
≥30	437 (18)	304 (20)		195 (21)		103 (19)	
Missing	340 (14)	313 (21)		208 (23)		100 (18)	
CRC family history			<0.001		<0.001		<0.001
No CRC family history	2,212 (89)	1,162 (78)		719 (79)		425 (76)	
Only 2nd degree relatives	65 (3)	58 (4)		37 (4)		20 (4)	
≥1 first degree relatives	207 (8)	255 (17)		145 (16)		107 (19)	
Missing	11 (0)	13 (1)		9 (1)		4 (1)	
	Mean [SD]	Mean [SD]	p-values	Mean [SD]	p-values	Mean [SD]	p-values
Diet related variables							
Total energy (cal/d)	1,901.3 [557.4]	2,019.3 [631.3]	<0.001	1,989.1 [611.1]	<0.001	2,061.0 [657.6]	<0.001
Fruits (g/d)	357.0 [217.2]	349.8 [199.0]	0.548	360.0 [200.5]	0.42	337.3 [197.2]	0.071
Vegetables (g/d)	193.8 [122.9]	175.9 [106.3]	<0.001	181.5 [107.8]	0.009	169.1 [104.1]	<0.001
Red/processed meat (g/d)	61.9 [38.1]	74.9 [47.8]	<0.001	72.3 [45.8]	<0.001	78.6 [50.2]	<0.001
Smoked cold meat/fish (g/d)	3.3 [8.4]	2.9 [8.3]	<0.001	2.7 [7.8]	<0.001	3.1 [8.9]	0.003
Nuts (g/d)	7.9 [13.3]	7.1 [12.2]	0.008	7.1 [12.8]	0.003	7.0 [11.4]	0.357
Dairy (g/d)	364.9 [186.1]	366.6 [190.4]	0.995	376.1 [189.9]	0.234	352.8 [191.6]	0.147
Fiber (g/d)	22.9 [9.1]	22.5 [8.2]	0.301	22.5 [8.1]	0.417	22.5 [8.4]	0.606

(Continued)



TABLE 1 | Continued

Variable	Controls (N = 2,495)	Cases <sup>a</sup>					
		All (N = 1,488)		Colon (N = 910)		Rectum (N = 556)	
		Mean [SD]	p-values	Mean [SD]	p-values	Mean [SD]	p-values
Calcium (mg/d)	924.8 [306.2]	934.1 [326.6]	0.651	942.4 [326.5]	0.301	924.0 [329.1]	0.702
D vitamin (mcg/d)	2.7 [1.5]	2.8 [1.6]	0.951	2.7 [1.6]	0.717	2.8 [1.7]	0.716
METS 2–12 years before diagnosis	154.8 [263.1]	141.8 [260.6]	<0.001	129.2 [237.3]	<0.001	163.3 [295.9]	0.035

BMI, Body mass index; CRC, Colorectal cancer; METS, Metabolic Equivalent Units.

<sup>a</sup>For 22 cases site information was not available.

<sup>b</sup>Values represent mean and standard deviations.

<sup>c</sup>Alcohol intake categories (based on g/d of ethanol intake): Light:  $\leq 6$ ; Upper recommended limit: women  $>6$  to  $\leq 12$  and men  $>6$  to  $\leq 24$ ; Abundant: women:  $>12$  to  $\leq 24$  and men  $>24$  to  $\leq 60$ ; Heavy/Very heavy: women  $>24$  and men  $>60$ . For continuous variables, analysis was done over participants with complete information: 2,216 controls and 1,313 cases for diet variables; 2,494 controls and all cases for physical activity (METS). In the multivariable logistic regression analysis including variables with a  $p < 0.10$  in any of the comparisons in the table, age, education, family history of colorectal cancer, total energy intake, and intakes of vegetables, nuts, red and processed meat, and smoked food were associated with CRC at a  $p < 0.05$ .

TABLE 2 | Seroprevalence for *H. pylori* proteins among infected<sup>a</sup> controls and colorectal cancer cases.

	Cases <sup>b</sup>			
	Controls	All	Colon	Rectum
	(N = 2,186)	(N = 1,335)	(N = 814)	(N = 500)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
GroEL+	1,962 (90)	1,234 (92)	757 (93)	459 (92)
NapA+	1,806 (83)	1,138 (85)	692 (85)	429 (86)
HP231+	1,758 (80)	1,055 (79)	637 (78)	401 (80)
Omp+	1,613 (74)	990 (74)	586 (72)	387 (77)
HyuA+	1,440 (66)	906 (68)	553 (68)	338 (68)
VacA+	1,346 (62)	790 (59)	471 (58)	307 (61)
Catalase+	1,308 (60)	760 (57)	464 (57)	287 (57)
UreA+	1,198 (55)	710 (53)	433 (53)	267 (53)
HP305+	1,169 (53)	658 (49)	391 (48)	256 (51)
CagA+	1,168 (53)	743 (56)	465 (57)	269 (54)
CagM+	1,100 (50)	677 (51)	412 (51)	257 (51)
Cagδ+	1,065 (49)	590 (44)	339 (42)	242 (48)
HcpC+	989 (45)	563 (42)	334 (41)	221 (44)
HpaA+	804 (37)	435 (33)	270 (33)	163 (33)
HomB+	779 (36)	456 (34)	279 (34)	173 (35)
Cad+	711 (33)	410 (31)	251 (31)	154 (31)
Number of proteins+				
4–7	716 (33)	457 (34)	280 (34)	171 (34)
7–12	1,043 (48)	665 (50)	412 (51)	241 (48)
$\geq 12$	427 (20)	213 (16)	122 (15)	88 (18)
Number of proteins+ <sup>c</sup>	8.9 [2.8]	8.7 [2.6]	8.7 [2.6]	8.9 [2.6]

<sup>a</sup>Positive for 4 or more *H. pylori* proteins.

<sup>b</sup>For 22 cases site information was not available.

<sup>c</sup>Mean [SD] of the number of proteins against which antibody reactivities were above the corresponding cut-off value.

lower risk of left colon cancer, although result of the statistical test for heterogeneity was not significant.

Among *H. pylori* infected subjects, only seropositivity against GroEL and NapA showed a positive association with CRC

risk, although CIs were wide (Figure 2). On the contrary, seropositivity to HP305, HpaA, and Cagδ was related to a 15–21% lower risk of CRC compared to seronegativity against each of these proteins. An inverse relation was observed between the number of seropositivities and CRC risk, showing a 3% lower risk for each seropositive protein. No remarkable differences were apparent in the direction or the magnitude of these associations depending on tumor site. Only the estimated effect of Cagδ showed heterogeneity among sites according to the statistical test. Seropositivity for this protein was associated with a 26 and 32% lower risk of right and left colon cancer, respectively, while only a non-statistically significant 6% lower risk was observed for rectum cancer. Additionally, for HP305 and HpaA the magnitude of the association was stronger (lower ORs) and statistically significant for left colon cancer, although the direction of the estimated ORs were the same (under the unity) for all sites and statistical test for heterogeneity did not reach the significance level (Figure 2). Additional adjustment of the models by BMI, ethanol consumption and diet factors resulted in a stronger inverse association for some of the antigens' serostatus (Supplementary Figure 1).

Adjusting simultaneously by serostatus against all those proteins individually associated with risk (GroEL, HP305, HpaA, Cagδ, and Catalase), only Cagδ remained inversely associated at a statistically significant level with CRC (OR = 0.81; 95% CI: 0.70–0.94). By tumor site, Cagδ seropositivity remained inversely associated with right and left colon cancers (OR = 0.76; 95% CI: 0.60–0.96 and OR = 0.71; 95% CI: 0.57–0.88, respectively) and HP305 only with left colon cancer (OR = 0.75; 95% CI: 0.60–0.94). Seropositivity to GroEL appeared related to a higher CRC (OR = 1.33; 95% CI: 1.01–1.74) and left colon cancer risk (OR = 1.62; 95% CI: 1.06–2.48). For rectal cancer, ORs showed the same directions than for the other sites, but with wider CIs, and none of them was statistically significant. Heterogeneity among tumor sites was nearly statistically significant only for the effect of Cagδ ( $p = 0.055$ ). A dose-response pattern was observed for these associations. Higher seroreactivity against GroEL was associated with increasing CRC risk (8% higher for each tertile with respect to seronegativity;  $p = 0.049$ ), and for Cagδ and

TABLE 3 | Association between colorectal cancer and *H. pylori* infection.

	Colorectal <sup>a</sup>			Right colon <sup>b</sup>			Left colon <sup>b</sup>			Rectum <sup>b</sup>			
	OR	95% CI	p-values	OR	95% CI	p-values	OR	95% CI	p-values	OR	95% CI	p-values	p-het
<b>MODEL 1</b>													
<i>H. pylori</i> +	1.03	0.83–1.29	0.775	1.33	0.90–1.96	0.150	0.84	0.62–1.13	0.244	1.05	0.77–1.44	0.761	0.118
Number of proteins+													
<4	1.00			1.00			1.00			1.00			
4–7	1.08	0.85–1.38	0.522	1.35	0.89–2.04	0.164	0.89	0.64–1.24	0.492	1.12	0.79–1.57	0.533	0.231
7–12	1.09	0.86–1.37	0.483	1.45	0.97–2.18	0.069	0.88	0.64–1.22	0.453	1.06	0.76–1.48	0.715	0.114
≥12	0.81	0.62–1.07	0.135	0.99	0.62–1.59	0.981	0.62	0.42–0.92	0.016	0.90	0.61–1.32	0.592	0.178
Trend	0.94	0.87–1.02	0.120	0.99	0.88–1.13	0.914	<b>0.88</b>	<b>0.79–0.98</b>	<b>0.026</b>	0.95	0.86–1.06	0.404	0.264
<b>MODEL 2</b>													
<i>H. pylori</i> +	0.91	0.71–1.16	0.434	1.14	0.74–1.73	0.556	0.72	0.52–1.01	0.059	0.95	0.68–1.34	0.784	0.168
Number of proteins+													
<4	1.00			1.00			1.00			1.00			
4–7	1.00	0.77–1.31	0.972	1.20	0.76–1.90	0.430	0.78	0.54–1.13	0.191	1.10	0.76–1.60	0.615	0.198
7–12	0.96	0.74–1.24	0.739	1.25	0.81–1.95	0.313	0.80	0.56–1.14	0.217	0.93	0.65–1.34	0.709	0.230
≥12	0.63	0.46–0.85	0.003	0.73	0.43–1.25	0.254	0.45	0.29–0.71	0.001	0.76	0.50–1.16	0.200	0.143
Trend	<b>0.87</b>	<b>0.80–0.95</b>	<b>0.002</b>	0.92	0.80–1.06	0.265	<b>0.82</b>	<b>0.72–0.93</b>	<b>0.002</b>	0.89	0.79–1.00	0.058	0.385
<b>MODEL 3</b>													
<i>H. pylori</i> +	0.87	0.67–1.12	0.276	1.04	0.67–1.62	0.856	<b>0.67</b>	<b>0.47–0.96</b>	<b>0.031</b>	0.95	0.66–1.36	0.768	0.177
Number of proteins+													
<4	1.00			1.00			1.00			1.00			
4–7	1.01	0.76–1.34	0.972	1.16	0.72–1.89	0.540	0.77	0.52–1.15	0.204	1.14	0.76–1.69	0.526	0.218
7–12	0.90	0.68–1.18	0.435	1.14	0.71–1.81	0.591	0.73	0.50–1.07	0.104	0.91	0.62–1.34	0.629	0.271
≥12	0.57	0.41–0.80	0.001	0.63	0.36–1.11	0.110	0.39	0.24–0.64	<0.001	0.73	0.47–1.15	0.176	0.104
Trend	<b>0.84</b>	<b>0.76–0.92</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.88	0.75–1.02	0.085	<b>0.78</b>	<b>0.68–0.89</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.87</b>	<b>0.76–0.99</b>	<b>0.033</b>	0.324

<sup>a</sup>From multilevel logistic regression mixed model.<sup>b</sup>From multinomial logistic regression mixed model.

Province was included as a random-effect term in all models. Model 1: Adjusted by age, sex and education. Model 2: Additionally adjusted by smoking status, body mass index and family history of colorectal cancer. Analysis based on 2,138 controls, 1,160 colorectal, 299 right colon, 394 left colon, and 450 rectal cancer cases with complete information for all the covariates. Model 3: Additionally adjusted by total energy intake, past ethanol intake, vegetables intake and red and processed meat intake. Analysis based on 1,914 controls, 1,031 colorectal, 265 right colon, 342 left colon and 409 rectal cancer cases with complete information for all the covariates. Trend corresponds to the OR for each increasing category of number of proteins seropositive. P-het, p-values for the heterogeneity among tumor sites. Associations with a  $p < 0.05$  are highlighted in bold.

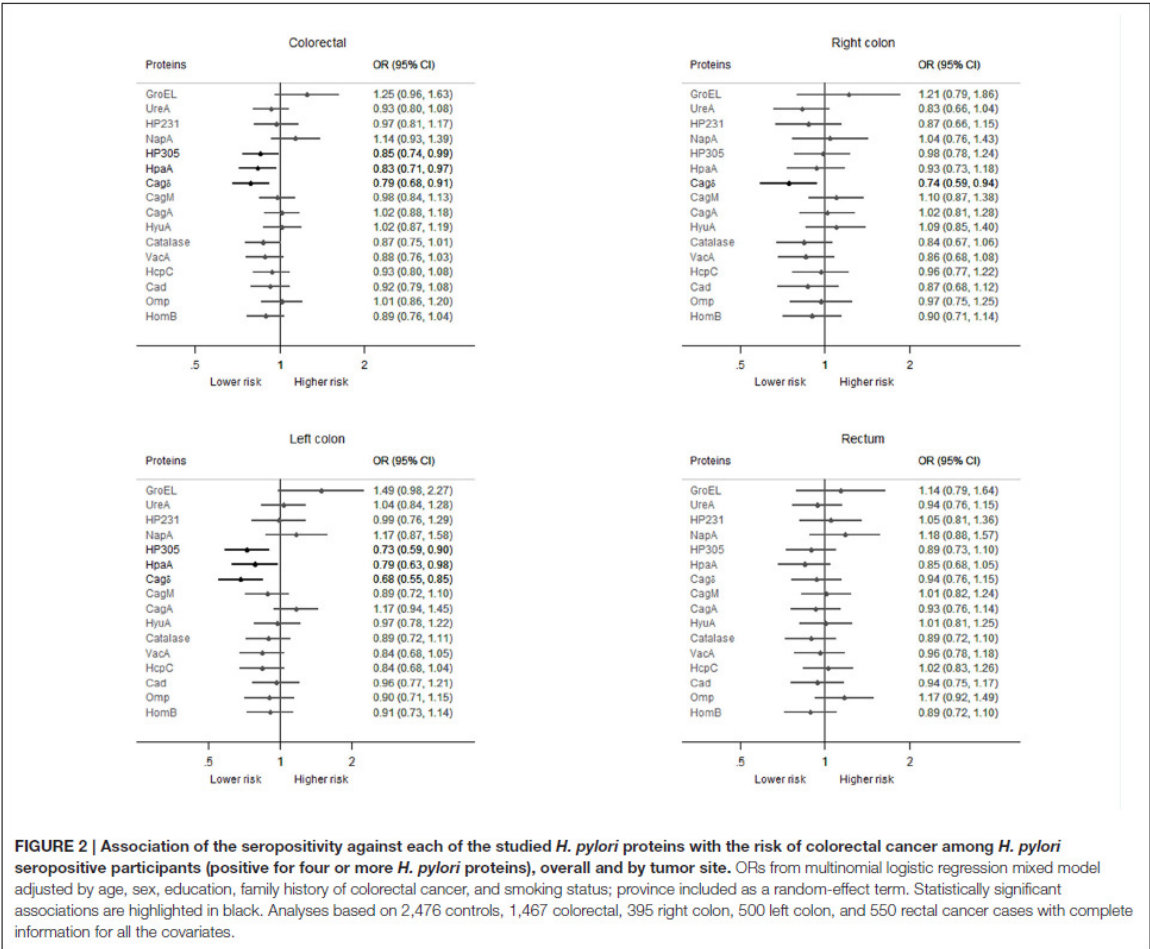
HP305 higher seroreactivities were associated with decreasing CRC risk: 11% ( $p < 0.001$ ) and 8% ( $p = 0.011$ ) lower for each tertile with respect to seronegativity, respectively. Results were similar for the three tumor sites analyzed, with no statistically significant heterogeneity.

Results from the analysis stratified by sex and age group suggested a different effect of *H. pylori* infection on the risk of CRC according to the combination of these characteristics. Women older than 64 years showed a nearly statistically significantly increased risk of CRC associated with *H. pylori* seropositivity (OR = 1.74; 95% CI: 0.99–3.08;  $p$ -value: 0.055), while no effect was observed for men of the same age group (OR = 1.18; 95% CI: 0.77–1.82;  $p$ -value: 0.452) or for younger women (OR = 0.95; 95% CI: 0.61–1.49;  $p$ -value: 0.834). On the other hand, in men under 65 years old *H. pylori* seropositivity was related to a lower CRC risk (OR = 0.61; 95% CI: 0.39–0.97;  $p$ -value: 0.036). The effect of seropositivity for individual proteins among infected subjects also showed differences by sex and age (Figure 3). Inverse associations were estimated for some proteins in men of the younger age group (<65 years old), while

for both, men and women over 64 years most of the estimated OR were around unity, showing no effect. Interaction was statistically significant for GroEL, HP231, HpaA, and HomB. GroEL was associated with an increased CRC risk mainly in the age group over 64 years, being the association statistically significant only for women. HP231 showed a lower CRC risk in men under 65, a nearly significantly higher risk in men older than 64, and no effect in women. HpaA showed a lower CRC risk in men of both age groups and no effect in women. Lastly, HomB seropositivity was related to a lower risk of CRC only in men older than 64, with no effect in the other three groups.

## DISCUSSION

This is one of the largest case-control studies published to date assessing the relation between CRC and *H. pylori* infection. Our results point to a lack of increased CRC risk associated with *H. pylori* infection. After controlling for the main known risk factors for CRC, neither *H. pylori* seropositivity, nor seropositivity against any of the analyzed proteins showed an

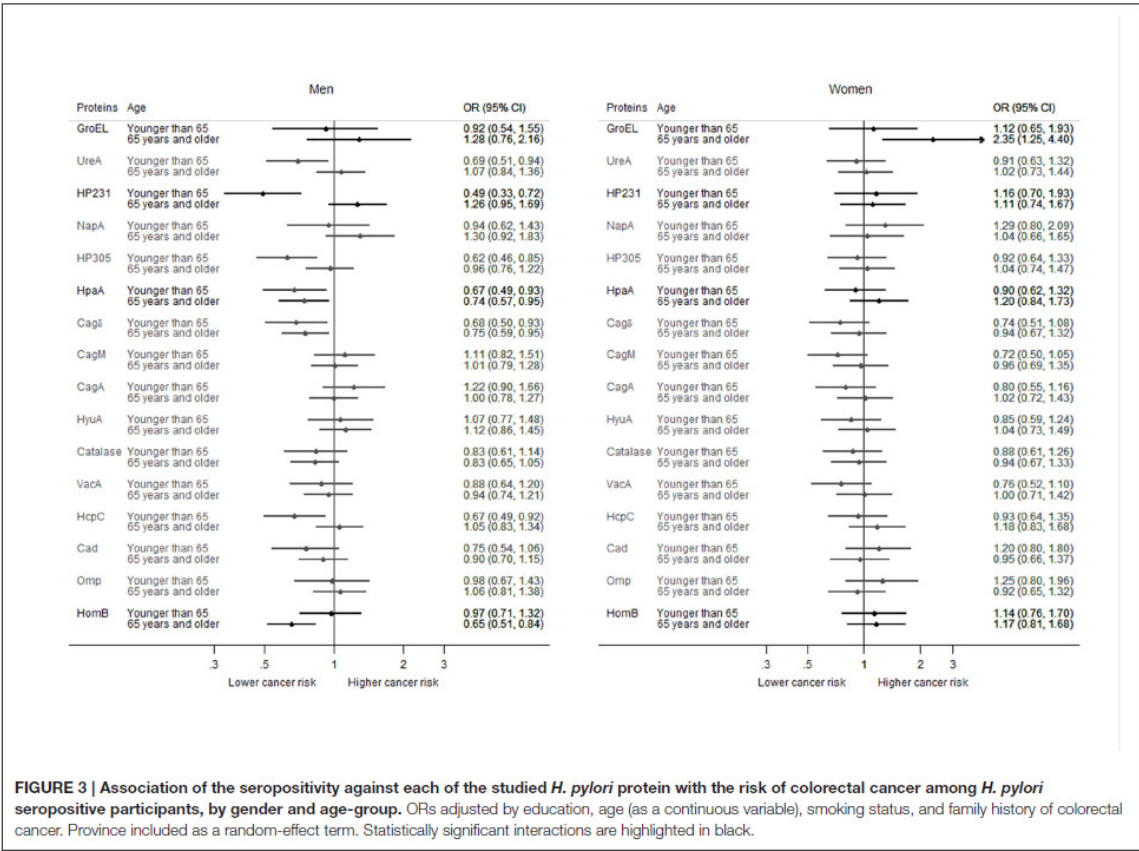


increased risk of colon or rectum cancer. On the contrary, seropositivity against some *H. pylori* proteins, such as HP305, HpaA, and Cagδ was associated with a 15–21% reduced risk of CRC among infected subjects. When mutually adjusting for serostatus against other proteins, only Cagδ continued to show a statistically significant inverse association with CRC. Although this result could be due to chance, the dose-response trend observed for seroreactivity against this protein precludes us from categorically discarding a real association between seropositivity to this protein and a lower risk of CRC. To our knowledge, no clear physiopathological mechanism has been described to explain a possible protective role of Cagδ positive *H. pylori* infection in the development of CRC. Cagδ is one of the proteins forming the *cag* Type IV Secretion System of *H. pylori*. Integrity of this system has been implicated in several mechanisms favoring gastric carcinogenesis, but the specific function of Cagδ has not been fully elucidated. If our results were replicated in other studies, in depth research on the functions of Cagδ would be warranted.

Interestingly, no increased risk was associated with seropositivity to CagA (cytotoxin-associated gene A). This protein is a cytotoxin injected by *H. pylori* into the epithelial cells of the host that has been implicated in gastric carcinogenesis. Therefore, this finding further supports a lack of association of *H. pylori* infection with an increased risk of CRC or, in case of such an association to exist, the involvement of other carcinogenic mechanisms different from those mediated by CagA cytotoxicity.

Seropositivity against GroEL, a protein pertaining to the group of chaperons that has been related to gastric and CRC in some previous studies (Gao et al., 2009; Epplen et al., 2013; Murphy et al., 2015), was associated with an increased CRC risk in infected subjects in our sample when adjusting by serostatus against other proteins. This result should be interpreted cautiously, given that this is a highly conserved protein and serological analysis may have lower specificity due to cross-reaction with the corresponding proteins of other species. On the other hand, this result could be considered as





supporting of a role of infections in general in the development of CRC.

Analyses stratified by age and sex showed some indications for a different association of the infection with the risk of CRC. *H. pylori* seropositivity was associated with a 74% higher odds of CRC in older women (4% increased risk for each additional seropositivity) and with a 39% lower risk in younger men (8% decreased risk for each additional seropositivity). With respect to the effect of seropositivity against individual proteins among *H. pylori* positive subjects, the decreasing risk associated with some of them was more evident in men and in younger age groups. Although age differences have been described on the relation of *H. pylori* infection and gastric cancer in some studies (Eybpoosh et al., 2015), there is not a general agreement in this point, neither a demonstration of such an effect for CRC. To the extent of our knowledge, no clear explanation has been largely accepted for this finding, and neither for a possible difference between men and women. However, this is a scarcely addressed issue and most of the published studies do not present their results stratified by age or sex, and consequently these factors are not generally included in sensitivity analyses of meta-analyses. An exception is the meta-analysis by Wu et al. (2013) that

reported their results stratified by sex. A higher effect of *H. pylori* infection on the risk of CRC was estimated in women than in men, although the number of studies included was low and the authors concluded that there was no evidence for a different effect by sex. Our results could be taken into account to promote the realization of analyses stratified by these factors, in order to ascertain whether such an effect modification exists.

Given that differences in the predominant carcinogenesis pathways have been reported between right and left colon cancer, we evaluated whether the consequences of *H. pylori* infection differed by tumor site. Although statistical test for heterogeneity did not reveal significant differences, the observed inverse associations were statistically significant mainly for left colon cancer. This was true both for *H. pylori* seropositivity and for individual proteins among infected subjects. Therefore, we are cautious before rejecting a potential differential effect by tumor site.

In agreement with our results, two recently published nested case-control studies using also the multiplex serology technique to test *H. pylori* infection reported no statistically significant association between *H. pylori* seropositivity and colorectal, colon, or rectum cancer (Epplein et al., 2013; Blase et al., 2016). They

did not find an association with CagA seropositivity either. However, Epplin et al. reported a higher risk of CRC for seropositivity against HcpC, HP305, VacA, HP231, and NapA, not encountered in our sample. These associations were further supported by a statistically significant dose-response pattern and were more evident for colon than for rectum cancer, although the low number of rectum cancer cases studied limits the interpretation of observed site-dependent differences, and they did not differentiate between right and left colon.

Regarding biological mechanisms that could be involved in a protective effect of *H. pylori* infection or of the infection with certain *H. pylori* strains over the development of CRC, several issues have to be mentioned. First of all, if *H. pylori* has been living with the human being for the last 50,000–70,000 years (Linz et al., 2007), one could assume that it has been playing a role in the ecosystem formed by human gastrointestinal tract microbiota. Therefore, in spite of the decrease of gastric cancer incidence largely attributed to the continuous reduction of *H. pylori* infection rates (secondary to the widespread use of antibiotics and the increase of the standard of living of most populations worldwide), the disappearance of *H. pylori* could be a cause of a detrimental alteration of the gastrointestinal microbiota (Kienesberger et al., 2016; Yap et al., 2016). The role of dysbiosis in human pathology is an area of increasing interest and the focus of multiple experimental and clinical research. With respect to CRC, several mechanisms have been proposed to explain the influence of gut microbiota on its development (Drewes et al., 2016). These include (1) a direct carcinogenic effect of individual bacterial species on the colonic epithelial cells, (2) an effect of the microbiota as a whole (which could modify the products derived from diet and metabolism, either in a beneficial or a harmful direction), or (3) mechanisms mediated by bacterial biofilm formation (such as favoring contact between bacteria and epithelial cells or causing a chronic inflammatory response). The disappearance of *H. pylori* infection would leave an ecological niche that, if occupied by harmful species could increase the risk of CRC (Butt et al., 2016; Drewes et al., 2016). Differences in the microbiota and in dietary habits between men and women and among age-groups in the population could therefore modulate the effect of *H. pylori* infection, which would be compatible with our finding of an effect modification associated with these factors.

Some limitations should be taken into account when interpreting our results. The case-control design of the study does not allow establishing or discarding causal relations. Also, residual confounding may remain due to lack of information about not measured potential confounding factors or to misclassification or insufficient accuracy of measured variables. In addition, a potential selection bias could be affecting our fully-adjusted results due to the lack of information on variables related to diet and BMI in a non-negligible proportion of subjects in our sample. However, in a sensitivity analysis done over the sample with complete data for these variables, the estimated ORs for *H. pylori* seropositivity and for number of proteins seropositive did not change after including these variables into the model (data not shown). With respect to the measurement of the exposure, classification of infection based on serological tests does not differentiate between current and past infection.

Besides, serological response depends not only on the exposure to the microorganisms but also on other factors such as the antigenicity of the different microbial proteins or the immune status of the host. Therefore, the interpretability of our results in terms of an effect directly attributed to the expression of proteins by *H. pylori* is limited. Particularly, a reverse causation secondary to immunosuppression potentially associated with cancer or oncological treatments cannot be ruled out. Lastly, the high *H. pylori* seroprevalence among controls in our sample, could lead to an underestimation of the OR.

This study has also several strengths. We included a high number of histologically confirmed incident colon and rectum cancer cases and recruited population-based controls. Furthermore, a reliable questionnaire was used which allowed to collect exhaustive information so that analyses were adjusted for many recognized CRC risk factors. In addition to the covariates included in the models presented here, we replicated all the analyses but adjusting also by the use of proton pump inhibitors and of non-steroidal anti-inflammatory drugs, and the results remained practically unaltered, which reinforces our confidence on the outcomes. Controlling for potential confounding factors has been determined as an important methodological tool in order to obtain unbiased estimates of the association between *H. pylori* infection and CRC (Zhang et al., 2012). In this same line, we did a crude analysis of our data, and the OR estimate for the association of *H. pylori* infection with CRC risk was 1.20, while the adjusted estimate was 0.85, supporting the importance of including potential confounding covariates in the statistical models and suggesting that some associations reported from studies done without such an adjustment could overestimate the effect. Besides, in our study statistical models included a random province-specific intercept term, which accounted for unexplained heterogeneity across different regions. The relatively high number of cases of rectum cancer included in our sample is other strength of the study, given that rectum cancer cases have frequently been underrepresented in other epidemiological studies in the field. In addition, we evaluated potential interactions by age, sex, and education. Finally, we used an emerging technology to measure the serological response against a wide range of *H. pylori* proteins, including some of the more widely recognized virulence factors, such as CagA, VacA, UreA, and Catalase.

To our knowledge, this is the first study that evaluates the association between *H. pylori* infection and CRC in Spain. Our results suggest that *H. pylori* seropositivity is not associated with a higher risk of colon or rectum cancer in the studied population. Antibody seroreactivity to CagA, highly associated with non-cardia gastric cancer, did not represent an increased risk either. On the contrary, we identified seropositivity against three individual proteins, mainly Cag $\delta$ , as markers of a reduced risk of CRC within this population, characterized by a high *H. pylori* seroprevalence. Our results point at a possible difference between sexes and age groups on the role of serological response against *H. pylori* infection either as a risk factor for or as a marker of CRC risk. If this finding was confirmed, differences in outcomes among published studies could be attributed in part to different population characteristics in terms of age and sex.



Lastly, no statistical heterogeneity was identified in the effect of the infection among tumor sites, although some indications of a decreased risk for left colon cancer were observed.

## ETHICS STATEMENT

The study protocol was approved by the Ethical Review Board of each participating center, and the study was carried out in accordance with their recommendations. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

NF analyzed the data, interpreted the results, and drafted the manuscript. NA, BP, EB, and MP planned and conducted the study, analyzed the data, interpreted the results, and reviewed the manuscript. AM, JB, MiP, TW, and BR performed serological assays, analyzed the data, interpreted the results, and reviewed the manuscript. VM, VMA, TD, JJ, JC, AT, IR, RP, AnT, MC, RO, IG, PL, AC, GC, MK, SS, and RC planned and conducted the study, interpreted the results and reviewed the manuscript. All authors have approved the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

## FUNDING

The study was supported by the “Acción Transversal del Cáncer,” approved on the Spanish Ministry Council on the 11th

October 2007, by the Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), by the Instituto de Salud Carlos III grants, co-funded by FEDER funds—a way to build Europe—(grants PI08/1770, PI09/0773, PI09/1286, PI09/1903, PI09/2078, PI09/1662, PI11/01403, PI14/00613, PI14/01219, and PI15/00069), by the Fundación Marqués de Valdecilla (grant API 10/09), by Catalan Government DURSI (grants 2014SGR647 and 2014SGR756), by the Junta de Castilla y León (grant LE22A10-2), by the Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (grant 2009-S0143), by the Regional Government of the Basque Country, and by the Conselleria de Sanitat of the Generalitat Valenciana (grant AP061/10). The funders had no role in the study design, data analysis, data interpretation or writing the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to all the participants in the MCC-Spain study. We also thank the interviewers and the professionals from different Hospital Departments and Primary Healthcare Centers for their collaboration.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00888/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Blase, J. L., Campbell, P. T., Gapstur, S. M., Pawlita, M., Michel, A., Waterboer, T., et al. (2016). Prediagnostic *Helicobacter pylori* antibodies and colorectal cancer risk in an elderly, caucasian population. *Helicobacter* 21, 488–492. doi: 10.1111/hel.12305
- Butt, J., Romero-Hernández, B., Pérez-Gómez, B., Willhauck-Fleckenstein, M., Holzinger, D., Martin, V., et al. (2016). Association of *Streptococcus gallolyticus* subspecies *gallolyticus* with colorectal cancer: serological evidence. *Int. J. Cancer* 138, 1670–1679. doi: 10.1002/ijc.29914
- Castañho-Vinyals, G., Aragonés, N., Pérez-Gómez, B., Martín, V., Llorca, J., Moreno, V., et al. (2015). Population-based multicase-control study in common tumors in Spain (MCC-Spain): rationale and study design. *Gac. Sanit.* 29, 308–15. doi: 10.1016/j.gaceta.2014.12.003
- Chang, A. H., and Parsonnet, J. (2010). Role of bacteria in oncogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 837–857. doi: 10.1128/CMR.00012-10
- Chen, Y.-S., Xu, S.-X., Ding, Y.-B., Huang, X.-E., and Deng, B. (2013). *Helicobacter pylori* infection and the risk of colorectal adenoma and adenocarcinoma: an updated meta-analysis of different testing methods. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14, 7613–7619. doi: 10.7314/APJCP.2013.14.12.7613
- Chen, X.-Z., Wang, R., Chen, H.-N., and Hu, J.-K. (2015). Cytotoxin-associated gene A-negative strains of *Helicobacter pylori* as a potential risk factor of pancreatic cancer: a meta-analysis based on nested case-control studies. *Pancreas* 44, 1340–1344. doi: 10.1097/MPA.0000000000000414
- Chen, X.-Z., Schöttker, B., Castro, F. A., Chen, H., Zhang, Y., Hollecsek, B., et al. (2016). Association of *Helicobacter pylori* infection and chronic atrophic gastritis with risk of colonic, pancreatic and gastric cancer: a ten-year follow-up of the ESTHER cohort study. *Oncotarget* 7, 17182–17193. doi: 10.18632/oncotarget.7946
- Drewes, J. L., Housseau, F., and Sears, C. L. (2016). Sporadic colorectal cancer: microbial contributors to disease prevention, development and therapy. *Br. J. Cancer* 115, 273–280. doi: 10.1038/bjc.2016.189
- Eppein, M., Pawlita, M., Michel, A., Peek, R. M., Cai, Q., and Blot, W. J. (2013). *Helicobacter pylori* protein-specific antibodies and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 22, 1964–1974. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0702
- Eyboosh, S., Talebkhani, Y., Saberi, S., Esmaeili, M., Oghalaie, A., Ebrahimzadeh, F., et al. (2015). Age-specific gastric cancer risk indicated by the combination of *Helicobacter pylori* sero-status and serum pepsinogen levels. *Iran. Biomed. J.* 19, 133–142. doi: 10.7508/ibj.2015.03.002
- Gao, L., Michel, A., Weck, M. N., Arndt, V., Pawlita, M., and Brenner, H. (2009). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk: evaluation of 15 *H. pylori* proteins determined by novel multiplex serology. *Cancer Res.* 69, 6164–6170. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0596
- Guo, Y., and Li, H.-Y. (2014). Association between *Helicobacter pylori* infection and colorectal neoplasm risk: a meta-analysis based on East Asian population. *J. Cancer Res. Ther.* 10(Suppl.), 263–266. doi: 10.4103/0973-1482.151482
- Hong, S. N., Lee, S. M., Kim, J. H., Lee, T. Y., Kim, J. H., Choe, W. H., et al. (2012). *Helicobacter pylori* infection increases the risk of colorectal adenomas: cross-sectional study and meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* 57, 2184–2194. doi: 10.1007/s10620-012-2245-x
- International Agency for Research on Cancer (2012). *A Review of Human Carcinogens. B. Biological Agents*. Lyon: IARC.
- Kienesberger, S., Cox, L. M., Livanos, A., Zhang, X.-S., Chung, J., Perez-Perez, G. I., et al. (2016). Gastric *Helicobacter pylori* infection affects local and distant microbial populations and host responses. *Cell Rep.* 14, 1395–1407. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.017

- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., et al. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445, 915–918. doi: 10.1038/nature05562
- Liu, C., and Zheng, P. (2016). The relationship of *Helicobacter pylori* infection and the risk of colon neoplasia based on meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 9, 2293–2300. doi: 10.1111/codi.12284
- Michel, A., Waterboer, T., Kist, M., and Pawlita, M. (2009). *Helicobacter pylori* multiplex serology. *Helicobacter* 14, 525–535. doi: 10.1111/j.1523-5378.2009.00723.x
- Mounika, P. (2013). *Helicobacter pylori* infection and risk of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer Int.* 2013, 1–6. doi: 10.1155/2013/131869
- Murphy, G., Michel, A., Taylor, P. R., Albanes, D., Weinstein, S. J., Virtamo, J., et al. (2014). Association of seropositivity to *Helicobacter* species and biliary tract cancer in the ATBC study. *Hepatology* 60, 1963–1971. doi: 10.1002/hep.27193
- Murphy, G., Freedman, N. D., Michel, A., Fan, J.-H., Taylor, P. R., Pawlita, M., et al. (2015). Prospective study of *Helicobacter pylori* antigens and gastric noncardia cancer risk in the nutrition intervention trial cohort. *Int. J. Cancer* 137, 1938–1946. doi: 10.1002/ijc.29543
- Papastergiou, V. (2016). *Helicobacter pylori* and colorectal neoplasia: is there a causal link? *World J. Gastroenterol.* 22:649. doi: 10.3748/wjg.v22.i2.649
- Rezaei, J., Tavakoli, H., Esfandiari, K., Ashegh, H., Hasibi, M., Ghanei, G., et al. (2008). Association between *Helicobacter pylori* infection and laryngo-hypopharyngeal carcinoma: a case-control study and review of the literature. *Head Neck* 30, 1624–1627. doi: 10.1002/hed.20918
- Rokkas, T., Sechopoulos, P., Pistolas, D., Kothonas, F., Margantinis, G., and Koukoulis, G. (2013). The relationship of *Helicobacter pylori* infection and colon neoplasia, on the basis of meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 1286–1294. doi: 10.1097/meg.0b013e328363d3cd
- Siddheshwar, R. K., Muhammad, K. B., Gray, J. C., and Kelly, S. B. (2001). Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in patients with colorectal polyps and colorectal carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 84–88. doi: 10.1111/j.1572-0241.2001.03355.x
- Sonnenberg, A., and Genta, R. M. (2013). *Helicobacter pylori* is a risk factor for colonic neoplasms. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 208–215. doi: 10.1038/ajg.2012.407
- Tatishchev, S. F., Vanbeek, C., and Wang, H. L. (2012). *Helicobacter pylori* infection and colorectal carcinoma: is there a causal association? *J. Gastrointest. Oncol.* 3, 380–385. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.058
- Trikudanathan, G., Philip, A., Dasanu, C. A., and Baker, W. L. (2011). Association between *Helicobacter pylori* infection and pancreatic cancer. A cumulative meta-analysis. *JOP* 12, 26–31.
- Wang, Y., Zhang, F.-C., and Wang, Y.-J. (2014). *Helicobacter pylori* and pancreatic cancer risk: a meta-analysis based on 2,049 cases and 2,861 controls. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 4449–4454. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.11.4449
- Waterboer, T., Sehr, P., Michael, K. M., Franceschi, S., Nieland, J. D., Joos, T. O., et al. (2005). Multiplex human papillomavirus serology based on *in situ*-purified glutathione s-transferase fusion proteins. *Clin. Chem.* 51, 1845–1853. doi: 10.1373/clinchem.2005.052381
- Wu, Q., Yang, Z.-P., Xu, P., Gao, L.-C., and Fan, D.-M. (2013). Association between *Helicobacter pylori* infection and the risk of colorectal neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis.* 15, e352–e364. doi: 10.1111/codi.12284
- Xiao, M., Wang, Y., and Gao, Y. (2013). Association between *Helicobacter pylori* infection and pancreatic cancer development: a meta-analysis. *PLoS ONE* 8:e75559. doi: 10.1371/journal.pone.0075559
- Yap, T. W.-C., Gan, H.-M., Lee, Y.-P., Leow, A. H.-R., Azmi, A. N., Francois, F., et al. (2016). *Helicobacter pylori* eradication causes perturbation of the human gut microbiome in young adults. *PLoS ONE* 11:e0151893. doi: 10.1371/journal.pone.0151893
- Zhang, Y., Hoffmeister, M., Weck, M. N., Chang-Claude, J., and Brenner, H. (2012). *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: evidence from a large population-based case-control study in Germany. *Am. J. Epidemiol.* 175, 441–450. doi: 10.1093/aje/kwr331
- Zhao, Y., Wang, F., Chang, D., Han, B., and You, D. (2008). Meta-analysis of different test indicators: *Helicobacter pylori* infection and the risk of colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* 23, 875–882. doi: 10.1007/s00384-008-0479-z
- Zumkeller, N., Brenner, H., Zwahlen, M., and Rothenbacher, D. (2006). *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Helicobacter* 11, 75–80. doi: 10.1111/j.1523-5378.2006.00381.x

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Fernández de Larrea-Baz, Michel, Romero, Pérez-Gómez, Moreno, Martín, Dierssen-Sotos, Jiménez-Moleón, Castilla, Tardón, Ruiz, Peiró, Tejada, Chirlaque, Butt, Olmedo-Requena, Gómez-Acebo, Linares, Boldo, Castells, Pawlita, Castaño-Vinyals, Kogevinas, de Sanjosé, Pollán, del Campo, Waterboer and Aragonés. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

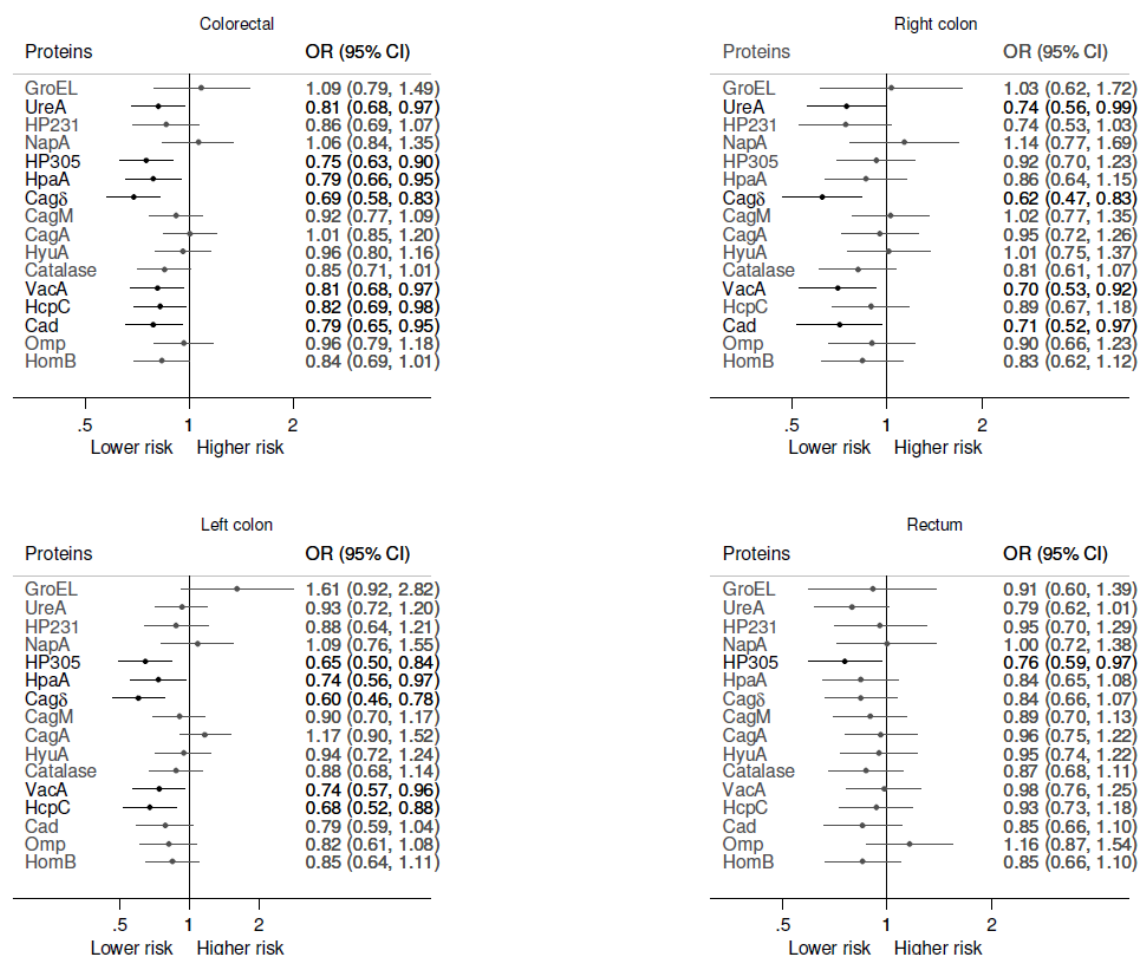


## Supplementary Material

### *Helicobacter pylori* Antibody Reactivities and Colorectal Cancer Risk in a Case-control Study in Spain

Nerea Fernández de Larrea-Baz\*, Angelika Michel, Beatriz Romero, Beatriz Pérez-Gómez, Víctor Moreno, Vicente Martín, Trinidad Dierssen-Sotos, José J. Jiménez-Moleón, Jesús Castilla, Adonina Tardón, Irune Ruiz, Rosana Peiró, Antonio Tejada, María D. Chirlaque, Julia A. Butt, Rocío Olmedo-Requena, Inés Gómez-Acebo, Pedro Linares, Elena Boldo, Antoni Castells, Michael Pawlita, Gemma Castaño-Vinyals, Manolis Kogevinas, Silvia de Sanjosé, Marina Pollán, Rosa del Campo, Tim Waterboer and Nuria Aragonés

\* Correspondence: Nerea Fernández de Larrea: nfernandez@externos.isciii.es



**Supplementary Figure 1.** Association of the seropositivity against each of the studied *H. pylori* proteins with the risk of colorectal cancer among infected participants (positive against 4 or more *H. pylori* proteins), overall and by tumor site. ORs from multinomial logistic regression mixed model adjusted by age, sex, education, family history of colorectal cancer, smoking status, body mass index, total energy intake, past ethanol intake, vegetables intake and red/processed meat intake; province included as a random-effect term. Statistically significant associations are highlighted in black. Analyses based on 1914 controls, 1031 colorectal, 265 right colon, 342 left colon and 409 rectal cancer cases with complete information for all the covariates.



## Supplementary Material

### *Helicobacter pylori* Antibody Reactivities and Colorectal Cancer Risk in a Case-control Study in Spain

Nerea Fernández de Larrea-Baz\*, Angelika Michel, Beatriz Romero, Beatriz Pérez-Gómez, Victor Moreno, Vicente Martín, Trinidad Dierssen-Sotos, José J. Jiménez-Moleón, Jesús Castilla, Adonina Tardón, Iruñe Ruiz, Rosana Peiró, Antonio Tejada, María D. Chirlaque, Julia A. Butt, Rocío Olmedo-Requena, Inés Gómez-Acebo, Pedro Linares, Elena Boldo, Antoni Castells, Michael Pawlita, Gemma Castaño-Vinyals, Manolis Kogevinas, Silvia de Sanjosé, Marina Pollán, Rosa del Campo, Tim Waterboer and Nuria Aragonés

\* **Correspondence:** Nerea Fernández de Larrea: nfernandez@externos.isciii.es

**Supplementary Table 1.** *H. pylori* proteins and cut-offs used for serostatus classification. All the proteins were expressed from *H. pylori* strain 26695, except GroEL, from strain G27 and HomB from strain J99. Criteria for choosing proteins for the assay were: known surface exposure and immunogenicity in two-dimensional immunoblot analyses (UreA, HP231, NapA, HpaA, CagA, Catalase and VacA), serologic association with gastric cancer (GroEL, HyuA, Cad, HcpC and Omp) and/or with gastric ulcer (HP305 and CagM), and specific recognition in *H. pylori*-positive sera (Cag $\delta$  and CagM). MFI: Median reporter Fluorescence Intensity. ORF: Open Reading Frame.

<i>H. pylori</i> proteins			Cut-off (MFI)
Short name (ORF no.)	Full name		
GroEL (HP10)	Chaperonin GroEL		100
UreA (HP73)	Urease alfa subunit		661
HP231 (HP231)	Hypothetical protein		100
NapA (HP243)	Neutrophil activating protein (bacterioferritin)		100
HP305 (HP305)	Hypothetical protein		100
HpaA (HP410)	Neuraminyl lactose-binding hemagglutinin homolog		246
Cag $\delta$ (HP522)	<i>cag</i> pathogenicity island protein $\delta$		717
CagM (HP537)	<i>cag</i> pathogenicity island protein M		100
CagA (HP547)	Cytotoxin-associated antigen A		3,338
HyuA (HP695)	Hydantoin utilization protein A		260
Catalase (HP875)	Catalase		976
VacA (HP887)	Vacuolating cytotoxin		570
HcpC (HP1098)	Conserved hypothetical secreted protein - paralogue HcpA		100
Cad (HP1104)	Cinnamyl-alcohol dehydrogenase ELI3-2		140
Omp (HP1564)	Outer membrane protein		809
HomB (-)	<i>H. pylori</i> outer membrane protein B		525

**Supplementary Table 2.** Clinico-pathological characteristics of cases

Variable	All (N=1,488)	Colon (N=910)	Rectum (N=556)
Tumor site			
Cecum	127 (9%)	127 (14%)	-
Ascending colon	166 (11%)	166 (18%)	-
Hepatic flexure	48 (3%)	48 (5%)	-
Transverse colon	61 (4%)	61 (7%)	-
Splenic flexure	35 (2%)	35 (4%)	-
Descending colon	81 (5%)	81 (9%)	-
Sigmoid colon	391 (26%)	391 (43%)	-
Rectosigmoid segment	84 (6%)	-	84 (15%)
Rectum	472 (32%)	-	472 (85%)
Not specified	23 (2%)	1 (0%)	0 (0%)
Histological type			
Adenocarcinoma	1,337 (90%)	807 (89%)	514 (92%)
Mucinous adenocarcinoma	94 (6%)	78 (9%)	14 (3%)
Signet ring adenocarcinoma	9 (1%)	8 (1%)	1 (0%)
Squamous carcinoma	1 (0%)	0 (0%)	1 (0%)
Medullary carcinoma	1 (0%)	1 (0%)	0 (0%)
Undifferentiated carcinoma	3 (0%)	3 (0%)	0 (0%)
Other	13 (1%)	5 (1%)	7 (1%)
Not specified/in situ	30 (2%)	8 (1%)	19 (3%)
Blood collection moment			
Prior/concomitant to treatment	525 (35%)	385 (42%)	133 (24%)
First 2 months after treatment	235 (16%)	168 (18%)	65 (12%)
>2 months after treatment	379 (25%)	160 (18%)	215 (39%)
Missing	349 (23%)	197 (22%)	143 (26%)
Initial treatment			
Surgery	1,040 (70%)	805 (88%)	223 (40%)
Chemotherapy	157 (11%)	33 (4%)	122 (22%)
Chemo-radiotherapy	100 (7%)	1 (0%)	99 (18%)
Radiation therapy	74 (5%)	5 (1%)	69 (12%)
Missing	117 (8%)	66 (7%)	43 (8%)

**Supplementary Table 3.** Association between potential confounding factors and *H. pylori* seropositivity in controls. HP -: Serology positive to less than 4 *H. pylori* proteins; HP +: Serology positive to at least 4 *H. pylori* proteins; BMI: Body mass index; CRC: Colorectal cancer; METS: Metabolic Equivalent Units. \*Alcohol intake categories (based on g/d of ethanol intake): Light:  $\leq 6$ ; Upper recommended limit: women  $>6 - \leq 12$  and men  $>6 - \leq 24$ ; Abundant: women:  $>12 - \leq 24$  and men  $>24 - \leq 60$ ; Heavy/Very heavy: women  $>24$  and men  $>60$ . \*\*Values represent mean and standard deviations. For continuous variables, analysis was done over participants with complete information: 266 non-infected controls and 1889 infected controls for BMI; 266 non-infected controls and 1950 infected controls for diet variables; all non-infected controls and 2185 infected controls for physical activity measurement (METS). In the multivariable logistic regression analysis including variables with a  $p$ -value $<0.10$  in the univariable analysis presented in the table, sex and vegetables intake were associated to *H. pylori* seropositivity at a  $p$ -value $<0.05$ .

Variable	HP – (N=309)	HP + (N=2,186)	p-value
Sex			
Male	106 (34%)	1,169 (53%)	<0.001
Female	203 (66%)	1,017 (47%)	
Race			
White/Caucasian	306 (99%)	2,145 (98%)	0.504
Other	3 (1%)	39 (2%)	
Education			
No/incomplete primary school	43 (14%)	439 (20%)	<0.001
Primary school	84 (27%)	807 (37%)	
Secondary school	105 (34%)	580 (27%)	
University degree	77 (25%)	360 (16%)	
Smoking status			
Never smoker	142 (46%)	957 (44%)	0.219
Former smoker	93 (30%)	761 (35%)	
Current smoker	74 (24%)	459 (21%)	
Past ethanol intake*			
No drinker	75 (24%)	536 (25%)	0.051
Light	63 (20%)	392 (18%)	
Upper recommended limit	66 (21%)	439 (20%)	
Abundant	49 (16%)	391 (18%)	
Heavy/Very heavy	13 (4%)	192 (9%)	
Missing	43 (14%)	236 (11%)	
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )			
<25	132 (43%)	656 (30%)	<0.001
25-29.9	91 (29%)	839 (38%)	
≥30	43 (14%)	394 (18%)	
Missing	43 (14%)	297 (14%)	
CRC family history			
No CRC family history	273 (88%)	1939 (89%)	0.950
Only 2 <sup>nd</sup> degree relatives	8 (3%)	57 (3%)	
≥1 first degree relative	26 (8%)	181 (8%)	
Missing	2 (1%)	9 (0%)	
Age (years)**	59.9 [12.9]	64.2 [11.4]	<0.001
Total energy (cal/d)**	1,862.4 [564.6]	1,906.7 [556.3]	0.105

Variable	HP – (N=309)	HP + (N=2,186)	p-value
Fruit (g/d)**	335.3 [214.0]	360.0 [217.5]	0.035
Vegetables (g/d)**	181.5 [117.1]	195.5 [123.6]	0.04
Red/processed meat (g/d)**	62.8 [42.8]	61.8 [37.4]	0.875
Smoked cold meat/fish (g/d)**	3.0 [6.7]	3.3 [8.6]	0.476
Nuts and dried fruits (g/d)**	9.4 [15.1]	7.7 [13.0]	0.008
Dairy (g/d)**	343.7 [188.3]	367.8 [185.6]	0.019
Fiber (g/d)**	22.1 [7.7]	23.1 [9.3]	0.229
Calcium (mg/d)**	898.5 [314.3]	928.4 [305.0]	0.041
D vitamin (mcg/d)**	2.7 [1.4]	2.7 [1.5]	0.858
METS 2-12y before diagnosis**	153.4 [271.4]	155.0 [262.0]	0.762

## Artículo 3

### Antibody reactivity against *Helicobacter pylori* proteins in a sample of the Spanish adult population in 2008-2013

© 2017 John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/hel.12401>

#### Resumen

#### Reactividad de anticuerpos frente a proteínas de *Helicobacter pylori* en una muestra de población adulta en España en 2008-2013

**Antecedentes:** diferencias en la expresión de proteínas por parte de *H. pylori* se han relacionado con el riesgo de enfermedades gástricas graves. En España se ha venido describiendo la existencia de un patrón geográfico en la mortalidad por cáncer gástrico.

**Objetivo:** caracterizar el patrón de reactividad de anticuerpos frente a 16 proteínas de *H. pylori* por edad, sexo y región de nacimiento en una amplia muestra de población adulta residente en España.

**Metodología:** la reactividad de anticuerpos fue cuantificada mediante la serología múltiple para *H. pylori* en una muestra de controles del estudio multicaso-control MCC-Spain. Para este análisis se incluyeron 2555 controles de base poblacional. Cada participante fue clasificado como seropositivo o seronegativo frente a cada una de las proteínas tomando puntos de corte específicos para cada una de ellas. Se definió como seroprevalencia global de *H. pylori* la positividad frente a cuatro o más proteínas. Se realizaron análisis descriptivos por edad, sexo y región de nacimiento tanto para la seroprevalencia global como para la serorreactividad (medida continua). Las diferencias entre grupos se analizaron mediante modelos de regresión logística y de regresión lineal.

**Resultados:** la seroprevalencia global de *H. pylori* aumentó con la edad en ambos sexos. Para las edades comprendidas entre 55 y 74 años, la seroprevalencia fue menor en mujeres que en hombres (84% frente a 92%,  $p < 0,001$ ). La región de nacimiento explicó un 7% de la variabilidad en la seroprevalencia. Entre los participantes *H. pylori* positivos, las proteínas con el mayor porcentaje de seropositividad fueron GroEL, NapA, HP231 y Omp. La seropositividad frente a la mayoría de las proteínas aumentaba o se mantenía estable con la edad, destacando el aumento frente a CagA, GroEL y HyaA en mujeres. No se observó un efecto cohorte claro.

**Conclusiones:** este es el primer estudio que describe el patrón de anticuerpos frente a 16 proteínas de *H. pylori* en población española. Encontramos variabilidad en el perfil de anticuerpos frente a *H. pylori* en función de factores individuales como la edad y el sexo, y de factores ambientales como


la región de nacimiento. La escasa reducción en el porcentaje de seropositividad en las edades más jóvenes pone de manifiesto que la importancia de esta infección en la población estudiada se mantiene en la actualidad.

DOI: 10.1111/hel.12401

## ORIGINAL ARTICLE

WILEY *Helicobacter*

# Antibody reactivity against *Helicobacter pylori* proteins in a sample of the Spanish adult population in 2008-2013

Nerea Fernández-de-Larrea<sup>1,2</sup>  | Angelika Michel<sup>3</sup> | Beatriz Romero<sup>4</sup> | Julia Butt<sup>3</sup> | Michael Pawlita<sup>3</sup> | Beatriz Pérez-Gómez<sup>1,2</sup> | Gemma Castaño-Vinyals<sup>5,6,7,2</sup> | Víctor Moreno<sup>2,8,9</sup> | Vicente Martín<sup>2,10,11</sup> | Pilar Amiano<sup>2,12</sup> | Jesús Castilla<sup>2,13</sup> | Guillermo Fernández-Tardón<sup>2,14</sup> | Trinidad Dierssen-Sotos<sup>2,15</sup> | Juan Clofent<sup>16,17</sup> | Juan Alguacil<sup>2,18</sup> | José María Huerta<sup>2,19</sup> | José Juan Jiménez-Moleón<sup>2,20,21</sup> | Aurelio Barricarte<sup>2,13</sup> | Amaia Molinuevo<sup>2</sup> | Tania Fernández-Villa<sup>10,11</sup> | Delphine Casabonne<sup>2,22</sup> | Ángeles Sierra<sup>1,2</sup> | Manolis Kogevinas<sup>5,6,7,2</sup> | Silvia de Sanjosé<sup>2,22</sup> | Marina Pollán<sup>1,2</sup> | Rosa del Campo<sup>4,23</sup> | Tim Waterboer<sup>3</sup> | Nuria Aragonés<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Environmental and Cancer Epidemiology Area, National Center of Epidemiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBER of Epidemiology and Public Health), Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

<sup>3</sup>Division of Molecular Diagnostics of Oncogenic Infections, Infection, Inflammation and Cancer Program, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

<sup>4</sup>Department of Microbiology, Ramón y Cajal University Hospital (IRYCIS), Madrid, Spain

<sup>5</sup>ISGlobal, Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain

<sup>6</sup>IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain

<sup>7</sup>Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain

<sup>8</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>9</sup>Cancer Prevention and Control Program, Catalan Institute of Oncology-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>10</sup>The Research Group in Gene, Environment and Health Interactions (GIGAS), University of León, León, Spain

<sup>11</sup>Faculty of Health Sciences, Area of Preventive Medicine and Public Health, Department of Biomedical Sciences, University of León, León, Spain

<sup>12</sup>Public Health Division of Gipuzkoa, BioDonostia Research Institute, San Sebastián, Spain

<sup>13</sup>Instituto de Salud Pública de Navarra – Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), Pamplona, Spain

<sup>14</sup>IUOPA, University of Oviedo, Oviedo, Spain

<sup>15</sup>IDIVAL, University of Cantabria, Santander, Spain

<sup>16</sup>Gastroenterology Department, Sagunto University Hospital, Sagunto, Spain

<sup>17</sup>Gastroenterology Department, La Fe University and Politecnical Hospital, Valencia, Spain

<sup>18</sup>Centro de Investigación en Recursos Naturales, Salud, y Medio Ambiente (RENSMA), Universidad de Huelva, Huelva, Spain

<sup>19</sup>Department of Epidemiology, Murcia Regional Health Council, IMIB-Arrixaca, Murcia, Spain

<sup>20</sup>Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), Granada Health Research Institute (ibs.GRANADA), Granada, Spain

<sup>21</sup>Department of Preventive Medicine and Public Health, University of Granada, Granada, Spain

<sup>22</sup>Cancer Epidemiology Research Program, Catalan Institute of Oncology-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>23</sup>Spanish Network for Research in Infectious Diseases, (REIPI) Red Española de Investigación en Patología Infecciosa, Sevilla, Spain

## Correspondence

Nerea Fernández de Larrea, Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Epidemiología, Madrid, Spain.  
Email: nfernandez@externos.isciii.es

## Abstract

**Background:** Differences in *Helicobacter pylori* protein expression have been related to the risk of severe gastric diseases. In Spain, a marked geographic pattern in gastric

## Funding information

This study was partially funded by the "Acción Transversal del Cáncer", approved on the Spanish Ministry Council on the 11th October 2007, by the Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), by the Instituto de Salud Carlos III grants, cofunded by FEDER funds -a way to build Europe- (grants PI08/1770, PI09/0773, PI09/1286, PI09/1903, PI09/2078, PI09/1662, PI11/01403, PI14/01219, PI14/00613 and PI15/00069), by the Fundación Marqués de Valdecilla (grant API 10/09), by Catalan Government DURSI (grant 2014SGR647 and 2014SGR756), by the Junta de Castilla y León (grant LE22A10-2), by the Consejería de Salud of the Junta de Andalucía (grant 2009-S0143), by the Regional Government of the Basque Country, and by the Conselleria de Sanitat of the Generalitat Valenciana (grant AP061/10). The funders had no role in the study design and data analysis. ISGlobal is a member of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya. Biological samples were stored at the biobanks supported by Instituto de Salud Carlos III- FEDER: Parc de Salut MAR Biobank (MARBioBank) (RD09/0076/00036), "Biobanco La Fe" (RD09/0076/00021) and FISABIO Biobank (RD09/0076/00058). Also at the Public Health Laboratory from Gipuzkoa, the Basque Biobank, the ICOBIOBANC (sponsored by the Catalan Institute of Oncology), the IUOPA Biobank from the University of Oviedo and the ISCIII Biobank

cancer mortality has long been reported. Objective: To characterize antibody reactivity patterns against 16 *H. pylori* proteins, by age, sex, and region of birth, in a large sample of the Spanish adult population.

**Materials and Methods:** Antibody reactivity was quantified by *H. pylori* multiplex serology in a sample from the control group of the multicase-control study MCC-Spain. For this analysis, 2555 population-based controls were included. Each participant was classified as seropositive or seronegative for each protein according to specific cut-offs. Overall *H. pylori* seroprevalence was defined as positivity against  $\geq 4$  proteins. Descriptive analyses by age, sex, and region of birth were performed for both seroprevalence and seroreactivity (continuous measure). Differences among groups were tested by logistic and linear regression models.

**Results:** Overall *H. pylori* seroprevalence increased with age in both sexes. For ages 55–74, seroprevalence was lower in women than in men (84% vs 92%,  $P < .001$ ). Region of birth explained 7% of the variability in seroprevalence. Among *H. pylori* seropositive subjects, proteins with the highest seroprevalence were GroEL, NapA, HP231, and Omp. Seropositivity for most of the proteins increased or remained stable with age, rising mainly for CagA, GroEL, and HyaA in women. A clear cohort effect was not observed.

**Conclusions:** This is the first study to describe the antibody patterns against 16 *H. pylori* proteins in the Spanish population. We found variability in the *H. pylori* antibody profiles according to both individual factors such as age and sex, and environmental factors such as the region of birth. The slightness of the reduction in seropositivity with decreasing age highlights the ongoing importance of this infection.

## KEYWORDS

*Helicobacter pylori*, multiplex serology, seroepidemiologic studies, seroprevalence, seroreactivity

## 1 | INTRODUCTION

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is one of the most frequent bacterial infections in humans. The discovery of *H. pylori* in 1983<sup>1</sup> and its implication in gastroduodenal ulcer and noncardia gastric cancer in 1994<sup>2</sup> meant to be a break in the etiological understanding of gastric diseases.

*Helicobacter pylori* infection is usually acquired during childhood and, if untreated, it is thought to persist throughout lifetime, causing chronic gastritis. The bacterium and the host are in a constant interaction, and *H. pylori* genome experiences modifications to adapt to the changing conditions in the gastric mucosa and to escape the host immune response.<sup>3</sup> In addition, reinfections may occur during lifetime, leading to even higher variability of bacterial strains infecting each person.<sup>4</sup>

Prevalence of infection varies greatly between countries. A recent systematic review of studies with national coverage reporting data for the late 1990s/early 2000s found that prevalence of infection at around the age of 60 years ranged from 22% in Australia to 90% in Mexico.<sup>5</sup> In Spain, there is not a nationwide prevalence study, but regional estimates have reported high prevalences, around 70%.<sup>6–9</sup>

Geographic variations have been described not only in the frequency of *H. pylori* infection, but also in the predominant strains

in different parts of the world.<sup>10</sup> Importantly, bacteria expressing certain proteins have been related to higher risk of developing severe diseases, such as peptic ulcer or noncardia gastric adenocarcinoma.<sup>11–13</sup>

In Spain, regional differences have been reported in gastric cancer mortality rates.<sup>14</sup> A persistent and unique geographic pattern, similar in women and men, has been described, suggesting the implication of environmental exposures that could affect both sexes.<sup>15</sup> Differences in the prevalence of *H. pylori* infection and type of infecting strain could partially explain differences in gastric cancer mortality, but have not been systematically addressed up to now.

The determination of antibody reactivity against *H. pylori* proteins is an indirect way to ascertain bacterial protein expression patterns. Analyzing the patterns of seroreactivity in population groups based on sex and age can provide insight into possible interactions between the bacterium and host characteristics. *H. pylori* multiplex serology is a fluorescent bead-based assay that allows simultaneous quantification of antibody reactivities against several antigens.<sup>16</sup> Using this technique, we analyzed the antibody response against 16 *H. pylori* proteins, including the virulence factors CagA and VacA, in a sample of population-based controls from the MCC-Spain



multicase-control study,<sup>17</sup> by age, sex, and geographic region of birth.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Study subjects

The study population derives from the MCC-Spain study (<http://www.mccspain.org/>). This is a multicase-control research conducted in 12 Spanish provinces where cases of five cancer types (at least two types in each province, among breast, colorectal, prostate, stomach cancer, and chronic lymphocytic leukemia) and population-based controls were included between 2008 and 2013. A common pool of controls was gathered for all tumors. Selection of controls was performed randomly from the lists of the insured people of the primary care centers participating in the study. The National Health System has universal coverage in Spain, and these lists include virtually all the population in the corresponding areas. Controls were frequency-matched to cases according to the age and sex distribution of cases included in each province. Participation rate among controls was 53%. For the present analysis, we studied the sample of controls corresponding to gastric or colorectal cancer cases that donated a blood sample that could be processed for *H. pylori* serologic determinations. Among the 4098 controls included in the MCC-Spain study, 2555 fulfilled the selection criteria for entering in this analysis. Reasons for exclusion were as follows: lack of any matched case of colorectal or stomach cancer in a certain sex and age group in the corresponding province of recruitment (N=125), no consent for blood sample collection (N=775), and blood sample not processed by *H. pylori* multiplex serology (N=643). Participants were interviewed by trained personnel, using a specifically designed questionnaire collecting detailed information on socio-demographics, diet, environmental exposures, and clinical variables. More details about the MCC-Spain methodology have been reported elsewhere.<sup>17</sup>

### 2.2 | Laboratory assays

Blood samples were processed and aliquoted locally in less than 48 hours (maintained refrigerated in the meantime). Then, they were stored at -80°C until being sent to the laboratory for serologic determinations. *H. pylori* multiplex serology<sup>16</sup> was used to quantify antibody reactivity against 16 *H. pylori* proteins: Cad (cinnamyl-alcohol-dehydrogenase ELI3-2), CagA (cytotoxin-associated antigen A), Cagδ (cag pathogenicity island protein 3), CagM (cag pathogenicity island protein 16), Catalase, GroEL (chaperonin GroEL), HcpC (Helicobacter cysteine-rich protein C), HomB (Helicobacter outer membrane B), HpaA (neuraminylactose-binding hemagglutinin homolog), HP231 (hypothetical protein HP231), HP305 (hypothetical protein HP305), HyuA (hydantoin utilization protein A), NapA (neutrophil activating protein A), Omp (outer membrane protein), UreA (urease alpha subunit), and VacA (vacuolating cytotoxin). Multiplex serology is a technique based on glutathione S-transferase (GST) capture immunosorbent assay in combination with fluorescent bead

technology. Briefly, bacterially expressed recombinant GST-*H. pylori* fusion proteins were used as antigens. The fusion proteins were loaded and affinity-purified directly on individual sets of spectrally distinct glutathione-casein-coupled fluorescence-labeled polystyrene beads (SeroMap, Luminex, Austin, TX, USA). Bead sorts, each with a different antigen, were mixed and incubated with human sera at 1:100 dilutions. Antibodies bound to the beads were stained with biotinylated anti-human-IgA, IgM, IgG (Dianova, Hamburg, Germany) and streptavidin-R-phycoerythrin. A Luminex 200 analyzer (Luminex Corp., Austin, TX, USA) was used to quantify the antibody bound to bacterial antigen via the median R-phycoerythrin fluorescence intensity of at least 100 beads of the same internal color. Bead and GST background subtracted median reporter fluorescence intensity (net median reporter fluorescence intensity) values were calculated.

To classify each serum as seropositive or seronegative, a median reporter fluorescence intensity cutoff value was defined for each of the 16 antigens based on the median reporter fluorescence intensity values obtained from 17 sera known to be *H. pylori* negative analyzed in the same assay. These cutoffs were fixed at the mean plus three standard deviations of the median reporter fluorescence intensity of each antigen (excluding positive outliers). As previously established,<sup>16</sup> *H. pylori* overall positivity was defined as seropositivity against four or more of the analyzed proteins (excluding HomB, because this protein was included in addition into the multiplex serology assay after the *H. pylori* positivity criterion had been validated). This definition was the one that maximized the concordance between *H. pylori* multiplex serology and commercial assays performed in a sample of the German population and reduced the overall false positive rate derived from isolated seropositivity for *H. pylori* individual proteins, leading to a sensitivity of 89% and a specificity of 82%.

### 2.3 | Ethical considerations

The study protocol was approved by the Ethical Committees of the collaborating institutions and by the Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal of the Instituto de Salud Carlos III, and the study was performed according to the Declaration of Helsinki. All patients gave written informed consent to participate.

### 2.4 | Statistical analysis

*Helicobacter pylori* overall seropositivity and seropositivity for each protein among *H. pylori* seropositive subjects were described for age and sex groups by calculating percentages and 95% confidence intervals. Differences in *H. pylori* seropositivity by age, sex, and region of birth were tested using the chi-squared test. Numbers of proteins recognized and median reporter fluorescence intensity values were summarized by calculating medians and interquartile ranges in the *H. pylori* seropositive group.

To describe geographic variability, Autonomous Communities of birth were grouped based on their geographic proximity into seven regions in order to have sufficient number of people to estimate

seroprevalences by sex and age group in each of them. The southern region included the Autonomous Communities of Andalucía, Canary Islands, Ceuta, and Melilla; the north/eastern inland region, Aragón, La Rioja, and Navarra; the north/western coastal region Asturias, Cantabria, and Galicia; the Central region, Castilla La Mancha, Extremadura, and Madrid; the north/western inland region, Castilla y León; the eastern coastal region, Cataluña, Balearic Islands, Murcia, and Valencia; and the north/central coastal region, the Basque Country.

Differences by age group and by sex in the percentage of seropositivity for each *H. pylori* protein were tested through logistic regression analysis, taking as the dependent variable protein serostatus (seropositive vs seronegative) and as independent variable age group or sex, stratifying by sex or age group, respectively. Differences by age and by sex in the number of antigens recognized were tested using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U*-tests, respectively. Differences by age group and by sex in the seroreactivity of each *H. pylori* protein among those seropositive for *H. pylori* and for the corresponding protein were tested through linear regression analysis, taking as the dependent variable protein seroreactivity (median reporter fluorescence intensity) and as independent variable age group and sex. Linear trend with age was assessed using a Wilcoxon-type test for trend<sup>18</sup> across ordered variables. A *P*-value <.05 was considered as the threshold for statistical significance.

Age-cohort graphs were elaborated to inspect the effect of each of these two components in the percentage of seropositivity for *H. pylori* and for individual *H. pylori* proteins among *H. pylori* seropositive subjects. Birth cohorts were grouped in 5-year groups, and the youngest age group (25-44 years old) was excluded due to low number of participants in this range of age.

To explore the variability attributable to place of birth in the percentages of seropositivity (for *H. pylori* and for each protein), intra-class correlation coefficients were estimated from logistic regression mixed models, including the Autonomous Community of birth as a random effect term and age and sex as fixed effects. For this analysis Autonomous Community was used without grouping in order to have a higher number of categories at this level, which is more appropriate to study variability in mixed models. On the other hand, subjects born in Ceuta or Melilla were excluded for this analysis due to low numbers, as well as those born in other countries, given that the objective of this analysis was to explore the intracountry variability.

### 3 | RESULTS

Table 1 summarizes main sociodemographic characteristics of the study sample. Overall, 51% were men. Mean age was 63.2 years ( $\pm 12.1$ ), lower in women than in men ( $59.5 \pm 13.3$  vs  $66.9 \pm 9.4$ ). Sociodemographic characteristics differed among age groups, mainly with respect to education, that was higher in younger groups, and number of siblings, that was greater in older groups. Differences were also observed between sexes, with respect to education, that was higher in men and to family socioeconomic level at birth, that was higher among women.

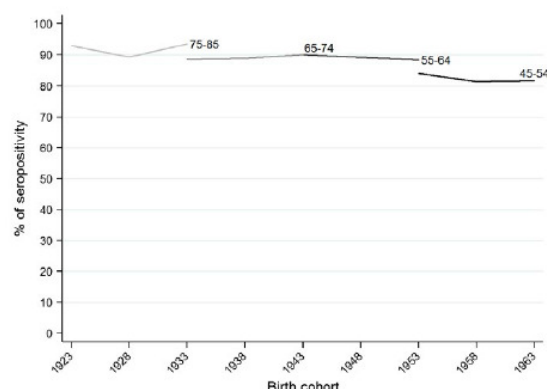
**TABLE 1** Sociodemographic characteristics of the study sample

	Number (%)
Sex	
Male	1293 (51)
Female	1262 (49)
Age group	
25-44	214 (8)
45-54	404 (16)
55-64	628 (25)
65-74	803 (31)
75-85	506 (20)
Region of birth	
Southern	327 (13)
N/E-inland	221 (9)
N/W-coast	285 (11)
Central	452 (18)
N/W-inland	559 (22)
Eastern coast	371 (15)
N/central-coast	222 (9)
Other countries	76 (3)
Missing	42 (2)
Race	
White/Caucasian	2509 (98)
Other	44 (2)
Missing	2 (0)
Education	
No/incomplete primary school	490 (19)
Primary school	898 (35)
Secondary school	703 (28)
University degree	464 (18)
Socioeconomic level at birth	
Low	1055 (41)
Intermediate	1247 (49)
High	88 (3)
Missing	165 (6)
Number of siblings	
Only child	110 (4)
1-2 siblings	948 (37)
3-6 siblings	1207 (47)
>6 siblings	284 (11)
Missing	6 (0)

N, North; E, East; W, West.

#### 3.1 | Overall *H. pylori* seroprevalence by age, sex, and region of birth

*Helicobacter pylori* seroprevalence increased with age in both sexes. The age effect seems to be more pronounced than the cohort effect (Figure 1). In every age group, seroprevalence was around 6% lower in



**FIGURE 1** Vertical axis represents the percentage of *Helicobacter pylori* seropositivity and horizontal axis the first year of each birth cohort (with a range of 5 years)

women than in men, although differences were statistically significant only for the 55-64 and 65-74 years age groups. The smallest difference between sexes was observed in the oldest age group (Table 2). Table S1 shows age and sex seroprevalence data stratified by region of birth. Difference in overall *H. pylori* seropositivity between regions (excluding the "other countries" region) ranged from 13% among 75-85 years old men to 30% among men and women in the youngest age group. Autonomous Community of birth explained 7.0% of the variability in *H. pylori* seroprevalence after taking into account age and sex differences (Table S2).

### 3.2 | Antigen-specific percentage of seropositivity in *H. pylori* seropositive subjects, by sex, age, and region of birth

The percentage of seropositivity for most of the proteins increased or remained stable with age in both sexes in the group of *H. pylori* seropositive subjects (Figure 2). GroEL and Cad showed statistically significant increases in seropositivity with age in men, as it was

observed for GroEL, NapA, CagA, HyuA, and Cad in women. On the contrary, seropositivity against some proteins showed a decreasing pattern with age. This was observed for HP231, HP305, and Omp in both sexes, and for HcpC in women. The graphical displaying of a possible birth cohort effect showed that the age effect prevails over the cohort effect for most of the proteins (Figure 3). In general, men had higher antigen-specific percentages of seropositivity than women, ranging from a 20% to a 74% higher percentage for those proteins with a statistically significant difference after adjusting by age group (GroEL, UreA, HP305, Cagδ, HyuA, Catalase, HcpC, Omp, and Homb). Figure S1 presents the range of protein-specific percentage of seropositivity among regions of birth, by age and sex. The largest difference between regions was observed for seropositivity for Catalase (overall difference between the highest and the lowest regions was 17%). The estimated percentage of variability in seropositivity that was explained by the Autonomous Community of birth among *H. pylori* seropositive subjects was between 0% for GroEL, UreA, HpaA, CagM, CagA, HyuA, and VacA and 1.7% for NapA (adjusted by age group and sex) (Table S2).

The number of proteins recognized was higher in men than in women in every age group (Figure 4). No trend was observed with age, although in women, the number of antigens recognized was higher in the intermediate age groups than in the youngest and the oldest groups ( $P$  value=.034).

### 3.3 | Median reporter fluorescence intensity for *H. pylori* proteins in *H. pylori* seropositive subjects, by sex, age, and region of birth

Among subjects seropositive for *H. pylori* and for each protein, seroreactivity measured as median reporter fluorescence intensity did not show statistically significant differences among age groups or sex for most of the proteins (Figure S2). Only for the seroreactivity against HP305 in men, an inverse linear trend with age was identified at the statistical significance level ( $P$ =.001). For HyuA and Omp, a higher seroreactivity was found in men with respect to women after adjusting for age ( $P$ =.028 and  $P$ =.009, respectively).

**TABLE 2** *Helicobacter pylori* seroprevalence by sex and age group in the whole sample

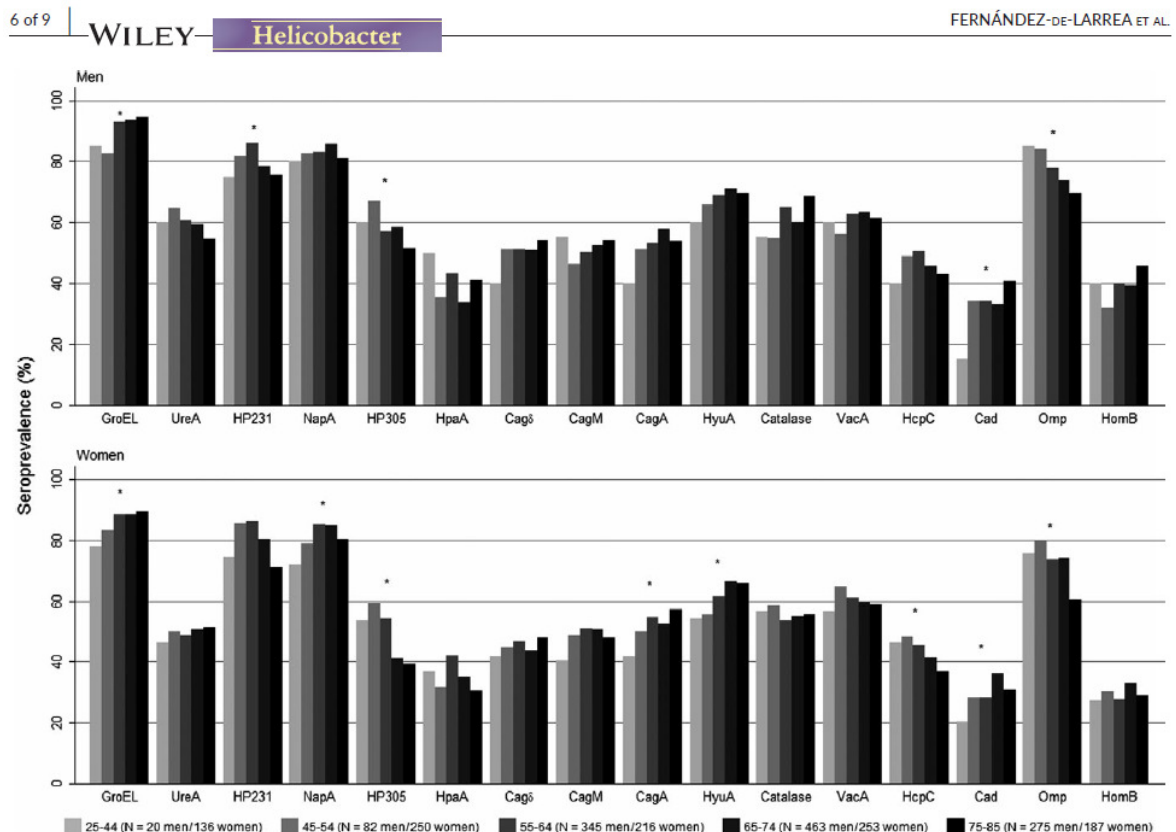
Age group	Men			Women			P-value <sup>a</sup>	Men to women seropositivity ratio
	n/N	%	(95% CI)	n/N	%	(95% CI)		
25-44	20/26	77	(56-91)	136/188	72	(65-79)	.622	1.1
45-54	82/94	87	(79-93)	250/310	81	(76-85)	.144	1.1
55-64	345/373	92	(89-95)	216/255	85	(80-89)	.002	1.1
65-74	463/502	92	(90-94)	253/301	84	(79-88)	<.001	1.1
75-85	275/298	92	(89-95)	187/208	90	(85-94)	.350	1.0
P-trend <sup>b</sup>			.053			<.001		

n/N: Number of seropositive subjects (n) among the total number of subjects (N) in each age-sex group.

<sup>a</sup>From chi-squared test for the comparison of *H. pylori* seroprevalence between sexes.

<sup>b</sup>From chi-squared trend test for *H. pylori* seroprevalence trend by age groups.





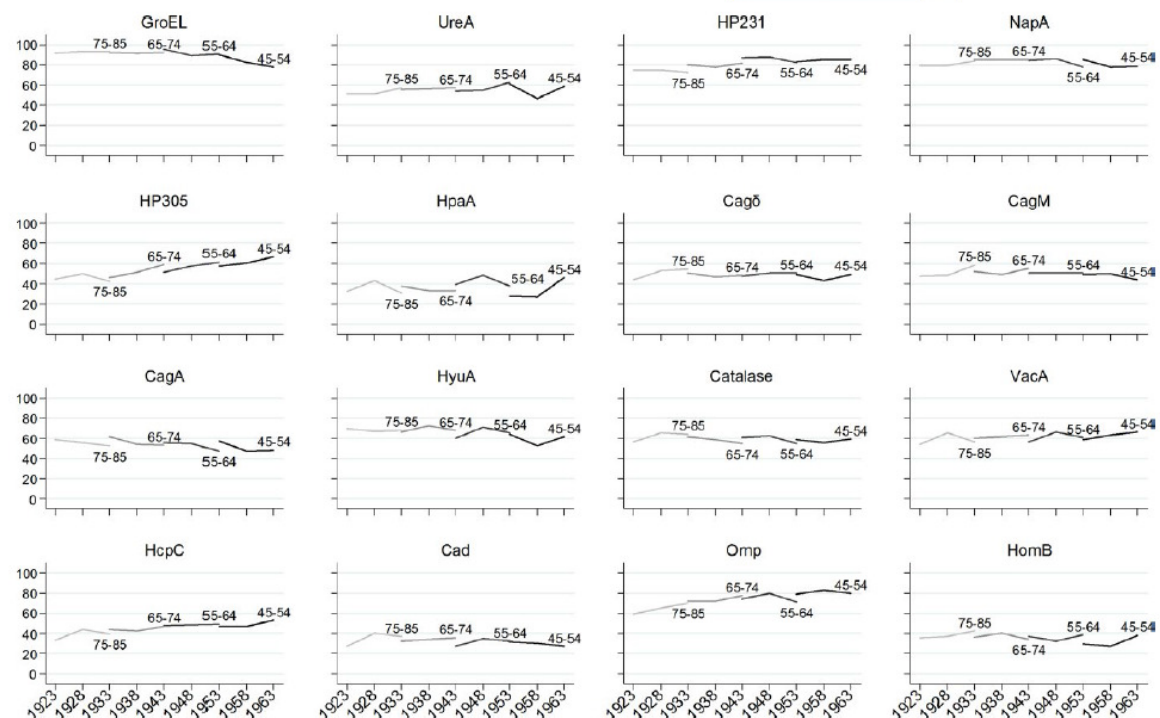
**FIGURE 2** Seropositivity against specific antigens in *Helicobacter pylori*-positive subjects by sex and age group. N: Number of subject in each age group. \*Statistically significant trend with age within sex

#### 4 | DISCUSSION

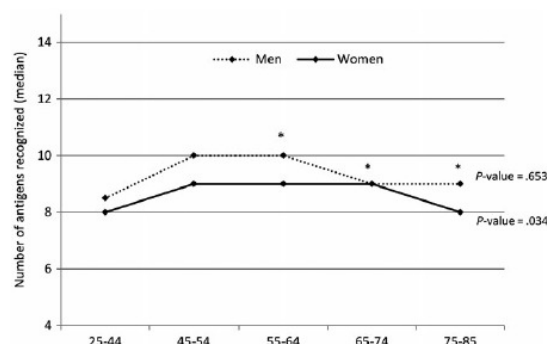
This study found a relatively high variability between sexes, age groups, and regions of birth not only in the overall *H. pylori* seroprevalence but also in the percentage of seropositivity against individual *H. pylori* proteins among *H. pylori* seropositive subjects, in a sample of the Spanish adult population.

*Helicobacter pylori* seroprevalence was slightly higher in men than in women in all the age-strata analyzed. This finding has been also described in other studies, but whether it is due to differences in the risk of infection according to gender or to other related factors has not been established. In our sample, men reported to have a lower socioeconomic level during childhood than women, which could partly explain the observed difference in seroprevalence. Among *H. pylori* seropositive subjects, women also had lower percentages of seropositivity than men for all the proteins even after adjusting by age group. Differences were highest for GroEL, HP305, and HomB proteins. No statistically significant differences were found between sexes for the seropositivity against recognized *H. pylori* virulence factors, CagA and VacA. When analyzing the intensity of serologic response, among positive subjects only HyuA and Omp antibody reactivities differed between sexes, being higher in men than in women.

With respect to the pattern of antibody response by age, *H. pylori* overall seroprevalence was higher in the older age groups, although in men, no further increase was observed from the age of 55 and upward, compared to women that showed a more gradual increase. Among *H. pylori* seropositive subjects, the percentage of seropositivity against some proteins increased with age, mainly among women. Noteworthy, CagA seropositivity increased with age in both sexes. Other proteins whose seropositivity also increased with age were GroEL and HyuA. These proteins participate, respectively, in the adhesion of *H. pylori* to epithelial cells in the gastric mucosa and the induction of the inflammatory response (GroEL) and in the synthesis of amino acids (HyuA)<sup>19</sup> and have also been proposed as *H. pylori* virulence factors. On the other hand, seropositivity against HP305, HcpC, and Omp decreased with age, which could be due to a lower survival capacity of strains expressing these proteins, which would lead to a loss of antibody levels with time. Alternatively, changes in the circulating strains over the course of the past century could be responsible for differences in serologic response patterns among birth cohorts. The lack of a decreasing trend in the seroreactivity with age suggests that either antigenicity of the studied proteins is high and/or repetitive exposure to the bacterium is frequent and acts as a booster for antibody response. Although no firm conclusions can be drawn from our exploration of the age-cohort effect, for overall *H. pylori*



**FIGURE 3** Vertical axes represent the percentage of seropositivity to the corresponding protein in *Helicobacter pylori*-positive subjects and horizontal axes the first year of each birth cohort (with a range of 5 years)



**FIGURE 4** Median of the number of proteins recognized in *Helicobacter pylori*-positive subjects, by sex and age group. *P*-values correspond to Kruskal-Wallis test for differences between age groups within each sex. Trend was not statistically significant neither among men nor among women. \*Statistically significant difference between men and women for the corresponding age group, from the Mann-Whitney *U*-test

seroprevalence, the age effect appears to be stronger than the cohort effect in our sample. Meanwhile, among those *H. pylori* seropositive, a cohort effect seems to be present for the percentage of seropositivity against some proteins, such as GroEL and CagA that showed a decreasing pattern, and HP305, VacA, HcpC and Omp that showed an increasing trend.

Regional differences in *H. pylori* overall seroprevalence and in protein-specific seropositivity among *H. pylori* seropositive individuals estimated in the age and sex stratified analysis showed a difference between the lowest and the highest regions of around 20%. Notably, the range of variability between regions of birth in the percentage of seropositivity against CagA was from 13% in the group of women 65-74 years old (43% in the region with the lowest seropositivity and 56% in the region with the highest) to 71% in the group of men 25-44 years old (from 0% to 71%). Although a straightforward comparison cannot be made from our data, they do not suggest the presence of a correlation between overall *H. pylori* seroprevalence and gastric cancer mortality rates among regions at an ecological level. N/W-inland and Central regions have both high seroprevalences and high gastric cancer age-standardized mortality rates, but on the other hand, regions, such as N/Central-coast and N/W-coast, have high gastric cancer mortality and a relatively low seroprevalence. In this line, in our sample region of birth explained a little proportion of the variability in the percentage of protein-specific seropositivity, which could suggest that individual characteristics may have a greater influence on antibody response patterns than environmental factors associated with place of birth. This would be in accordance with previous findings.<sup>20</sup> Nevertheless, environmental factors that have a distribution in the population that does not fit well to the regional grouping captured by Autonomous Community could still be responsible for part of the variability.

A study carried out in the German population<sup>19</sup> also encountered that the most frequent seropositive proteins among *H. pylori*

seropositive participants were GroEL and Omp, and the least frequent Cad. For the overall study sample, percentage of antigen-specific seropositivity was similar to that found in our population for most of the proteins, with the exception of VacA and HcpC that were less frequent, and HP231 and NapA that were more frequent in our sample. In agreement with their results, in our study the number of proteins recognized was higher in men than in women for all the age groups. An increasing percentage of antigen-specific seropositivity with age among *H. pylori* seropositive subjects was also observed in both studies for most of the studied proteins. On the other hand, higher antibody reactivity was observed with increasing age in the German study for some proteins, in contrast to our results that did not show any significant trend for most of the proteins. Given that in the German study the most prominent increase was observed under the 25-34 years age group and that our study did not include participants younger than 25 years old, these differences may, at least in part, explain the discrepancy between the studies in the behavior of antibody response intensity with age.

There is not much information about the specific seropositivity against most of the studied proteins for age and sex groups. Compared to data reported by Michel et al.<sup>19</sup> using also *H. pylori* multiplex serology, percentage of seropositivity for CagA was nearly 10% higher in the German sample when comparing the same age groups. Also, seropositivity against VacA was around 20% higher in the German study. These differences, although not big, could be significant given the role of these cytotoxins in the risk of developing chronic atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma. The higher seropositivity against CagA in older age groups in our sample could be a sign of a decreasing circulation of CagA-positive *H. pylori* strains, but it could also be the result of the cumulative exposure to different strains during the lifetime. The graphical representation of the seropositivity for CagA by age and birth cohort suggests that a cohort effect could be present, with a slight decrease in the seropositivity for this virulence factor in more recent cohorts. This cohort effect could also explain the higher CagA seropositivity found in the German study, which analyzed samples collected in the early eighties of the XXth century.

The main limitation of the present study is its cross-sectional design and short recruitment period, which does not allow discerning clearly whether the observed antibody reactivity patterns are the result of changes in the bacterial characteristics along time leading to a birth cohort effect, or whether they are the result of differences in the host serologic response depending on individual characteristics like age and sex. Another limitation is that the studied sample cannot be considered representative of the Spanish general population, as a consequence of the participation rate and the frequency-matching strategy used to recruit participants, in the context of the general methodology of the MCC-Spain study.<sup>17</sup> However, given that the results are presented stratified by these same variables, this limitation has been somewhat reduced. The small number of participants in some age-sex-region groups renders the estimated prevalence data unstable for these groups. This involves mainly the youngest age groups and regions in the south, north/eastern inland and north/western coast of the country. With respect to the *H. pylori* multiplex serology technique,

even if the concordance of its *H. pylori* overall positivity definition has been reported to be high with respect to the standard ELISA screening and Western blot confirmation assay in other population,<sup>16</sup> their results for individual proteins can be affected by some limitations, such as cross-reactivity among proteins from different bacteria.

Our study has also some strengths, like the population-based recruitment of controls, the high number of participants, allowing a detailed description of age and sex subgroups, and the geographic diversity within the country. As regards to the laboratory procedures, the low storage time of serum samples and the analysis of antibody reactivities against a wide set of *H. pylori* proteins represent also strengths of the study. Due to its high-throughput and simultaneous detection abilities, *H. pylori* multiplex serology has proved to be suitable in large epidemiologic studies,<sup>12,13,19,21-23</sup> such as the MCC-Spain, to assess *H. pylori* seroprevalence and antibody reactivity patterns.

To conclude, the description presented here of the antibody reactivity against 16 *H. pylori* proteins shows that there is a significant variability depending on both an environmental factor like geographic region and on individual factors such as age and sex. Regional differences observed in this study suggest that current and/or past variability in the circulating *H. pylori* strains may exist even at an intracountry level. Reasons for differences between men and women, and among age groups are less straightforwardly derived from the present study because of potential confounding factors like education or cohort of birth. The slightness of the observed decreasing pattern in *H. pylori* overall seroprevalence and in seropositivity for the main virulence factors associated with age highlights the importance of maintaining a high level of awareness in clinical practice for early detection of gastroduodenal ulcers and gastric adenocarcinoma, as well as efforts for primary prevention of gastric cancer. The presence of differences in the characteristics of *H. pylori* infecting humans of different ages and sexes may have a significant impact on the population health, given that the expression of some *H. pylori* proteins has been related to the risk of developing gastric diseases.

#### ACKNOWLEDGEMENTS AND DISCLOSURES

The authors acknowledge the participants in the MCC-Spain study, and the collaborators from participating hospitals and primary health-care centers. We are also grateful to Roberto Pastor for his statistical assistance in the analysis of the components of the variability.

#### CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no competing interests.

#### DISCLAIMER

The content and views of this publication are those of the author (s) and do not necessarily reflect the official position of the Instituto de Salud Carlos III.



## REFERENCES

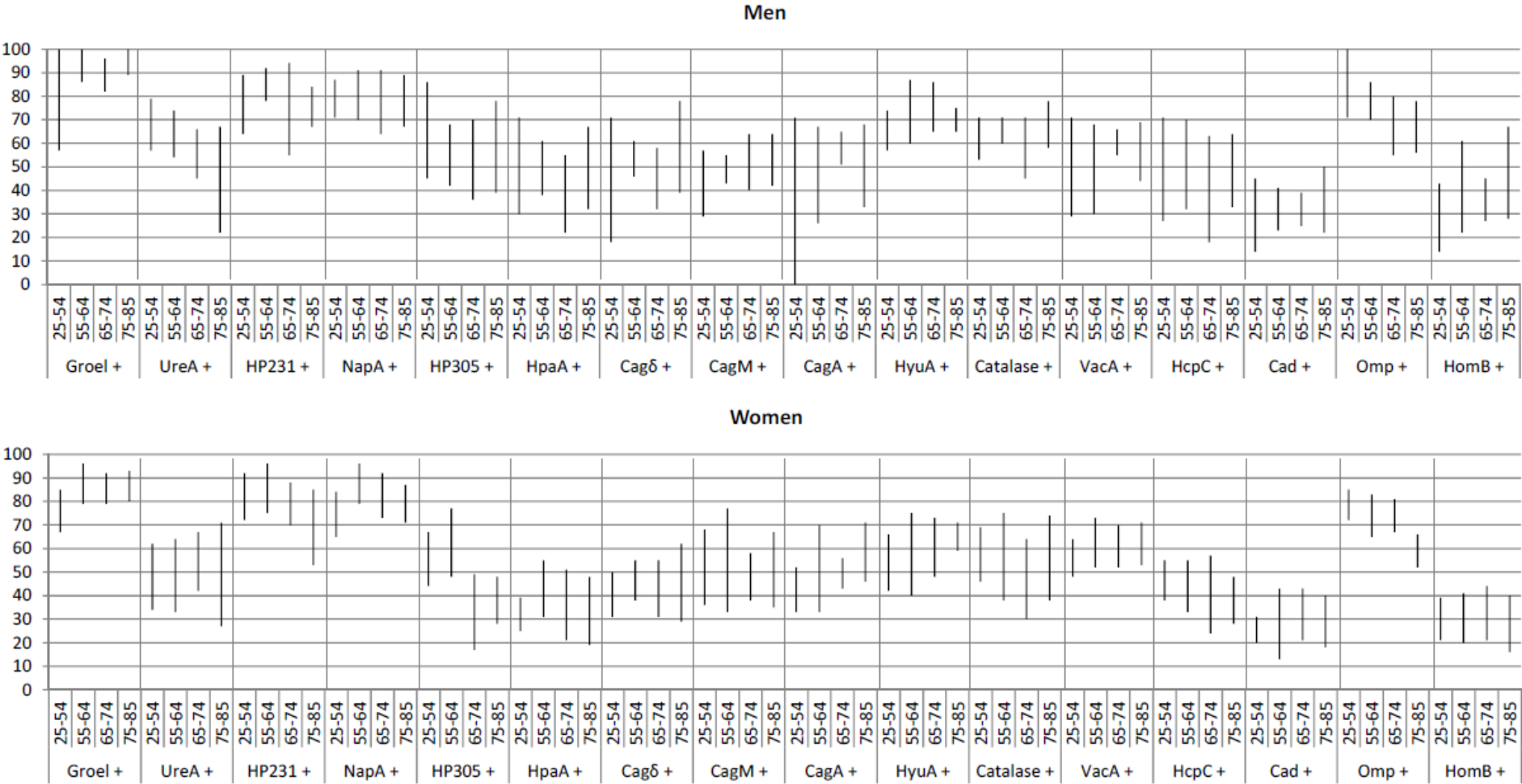
- Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983;1:1273-1275.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1994.1-241. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans). Report No.: 61.
- Zanotti G, Cendron L. Structural and functional aspects of the *Helicobacter pylori* secretome. *World J Gastroenterol*. 2014;20:1402-1423.
- Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology*. 2009;136:1863-1873.
- Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci*. 2014;59:1698-1709.
- Macenlle García R, Gayoso Diz P, Sueiro Benavides RA, Fernández Seara J. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the general adult population of the province of Ourense. *Rev Esp Enferm Dig*. 2006;98:241-248.
- Sánchez Ceballos F, Taxonera Samsó C, García Alonso C, Alba López C, Sainz de Los Terreros Soler L, Díaz-Rubio M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the healthy population of Madrid (Spain). *Rev Esp Enferm Dig* 2007;99:497-501.
- Cilla G, Pérez-Trallero E, García-Bengoechea M, Marimón JM, Arenas JI. *Helicobacter pylori* infection: a seroepidemiological study in Gipuzkoa, Basque Country, Spain. *Eur J Epidemiol*. 1997;13:945-949.
- Ráfols Crestani A, Solanas Saura P, Ramió Pujolràs G, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in primary health care. *Aten Primaria*. 2000;25:563-567.
- Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Intern Med*. 2008;47:1077-1083.
- Cover TL. *Helicobacter pylori* diversity and gastric cancer risk. *mBio*. 2016;7:e01869-15.
- Epplein M, Zheng W, Xiang Y-B, et al. Prospective study of *Helicobacter pylori* biomarkers for gastric cancer risk among chinese men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21:2185-2192.
- Gao L, Michel A, Weck MN, Arndt V, Pawlita M, Brenner H. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk: evaluation of 15 *H. pylori* proteins determined by novel multiplex serology. *Cancer Res*. 2009;69:6164-6170.
- Aragónés N, Goicoa T, Pollán M, et al. Spatio-temporal trends in gastric cancer mortality in Spain: 1975-2008. *Cancer Epidemiol*. 2013;37:360-369.
- Aragónés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, et al. The striking geographical pattern of gastric cancer mortality in Spain: environmental hypotheses revisited. *BMC Cancer*. 2009;9:316.
- Michel A, Waterboer T, Kist M, Pawlita M. *Helicobacter pylori* multiplex serology. *Helicobacter*. 2009;14:525-535.
- Castaño-Vinyals G, Aragónés N, Pérez-Gómez B, et al. Population-based multicase-control study in common tumors in Spain (MCC-Spain): rationale and study design. *Gac Sanit*. 2015;29:308-315.
- Cuzick J. A Wilcoxon-type test for trend. *Stat Med*. 1985;4:87-90.
- Michel A, Pawlita M, Boeing H, Gissmann L, Waterboer T. *Helicobacter pylori* antibody patterns in Germany: a cross-sectional population study. *Gut Pathog*. 2014;6:10.
- Strebel K, Rolfe-Kampczyk U, Richter M, Kindler A, Richter T, Schlink U. A rigorous small area modelling-study for the *Helicobacter pylori* epidemiology. *Sci Total Environ*. 2010;408:3931-3942.
- Shakeri R, Malekzadeh R, Nasrollahzadeh D, et al. Multiplex *H. pylori* serology and risk of gastric cardia and noncardia adenocarcinomas. *Cancer Res*. 2015;75:4876-4883.
- Murphy G, Freedman ND, Michel A, et al. Prospective study of *Helicobacter pylori* antigens and gastric noncardia cancer risk in the nutrition intervention trial cohort. *Int J Cancer*. 2015;137:1938-1946.
- Cai H, Ye F, Michel A, et al. *Helicobacter pylori* blood biomarker for gastric cancer risk in East Asia. *Int J Epidemiol*. 2016;45:774-781.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

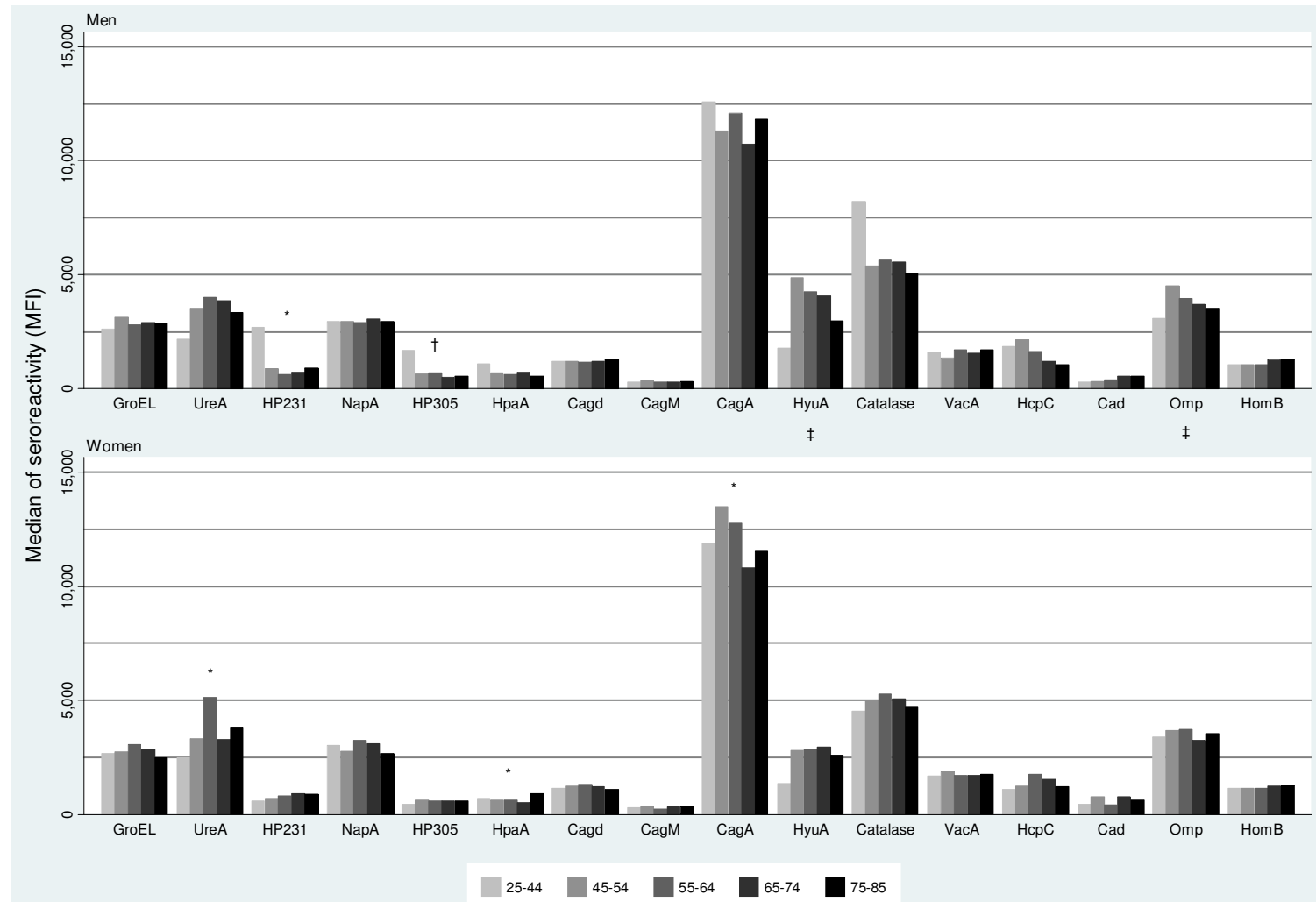
How to cite this article: Fernández-de-Larrea N, Michel A, Romero B, et al. Antibody reactivity against *Helicobacter pylori* proteins in a sample of the Spanish adult population in 2008-2013. *Helicobacter*. 2017;22:e12401. <https://doi.org/10.1111/hel.12401>

**Figure S1 (Helicobacter. 2017;e12401).** Range in the percentage of seropositivity for *H. pylori* proteins between the region of birth with the lowest and with the highest percentage, by sex and age-group in *H. pylori* seropositive subjects





**Figure S2 (Helicobacter. 2017;e12401).** Seroreactivity against specific antigens in subjects *H. pylori* seropositive and seropositive against the corresponding antigen, by sex and age group



\* Statistically significant difference among age groups within sex. † Statistically significant trend with age within sex. ‡ Statistically significant difference between sexes. MFI: Median Fluorescence Intensity.

Supplementary Tables. *Helicobacter*. 2017;e12401.Table S1. *H. pylori* seroprevalence by sex, age-group and region of birth

Age group	Birth region	Men			Women			p-value <sup>a</sup>
		n/N	%	(95% CI)	n/N	%	(95% CI)	
25-44	Southern	7/8	88	(47-100)	34/41	83	(68-93)	.749
	N/E-inland	7/8	88	(47-100)	36/41	88	(76-96)	.981
	N/W-coast	7/10	70	(35-93)	29/50	58	(43-72)	.480
	Central	23/30	77	(58-90)	82/100	82	(73-89)	.516
	N/W-inland	26/29	90	(73-98)	73/85	86	(77-92)	.604
	Eastern coast	19/21	90	(70-99)	31/43	72	(56-85)	.095
	N/central coast	11/11	100	(72-100)	48/72	67	(55-77)	.023
	Other countries	1/2	50	-	34/40	85	(70-94)	.195
	p-value <sup>b</sup>			.310			<.001	
55-64	Southern	65/71	92	(83-97)	20/22	91	(71-99)	.925
	N/E-inland	23/23	100	(85-100)	21/23	91	(72-99)	.148
	N/W-coast	32/40	80	(64-91)	22/30	73	(54-88)	.511
	Central	63/65	97	(89-100)	41/45	91	(79-98)	.187
	N/W-inland	73/77	95	(87-99)	48/54	89	(77-96)	.209
	Eastern coast	57/61	93	(84-98)	24/29	83	(64-94)	.114
	N/central coast	23/27	85	(66-96)	28/38	74	(57-87)	.266
	Other countries	5/5	100	(48-100)	7/8	88	(47-100)	.411
	p-value <sup>b</sup>			.027			.173	
65-74	Southern	88/96	92	(84-96)	26/28	93	(76-99)	.839
	N/E-inland	22/25	88	(69-97)	37/47	79	(64-89)	.330
	N/W-coast	49/56	88	(76-95)	24/31	77	(59-90)	.220
	Central	89/90	99	(94-100)	51/54	94	(85-99)	.116
	N/W-inland	121/127	95	(90-98)	50/56	89	(78-96)	.131
	Eastern coast	77/88	88	(79-94)	33/43	77	(61-88)	.115
	N/central coast	11/13	85	(55-98)	23/31	74	(55-88)	.452
	Other countries	4/5	80	(28-99)	8/10	80	(44-97)	1.000
	p-value <sup>b</sup>			.044			.068	
75-85	Southern	36/38	95	(82-99)	21/23	91	(72-99)	.600
	N/E-inland	19/20	95	(75-100)	31/34	91	(76-98)	.604
	N/W-coast	46/49	94	(83-99)	15/19	79	(54-94)	.069
	Central	36/39	92	(79-98)	29/29	100	(88-100)	.127
	N/W-inland	82/87	94	(87-98)	41/44	93	(81-99)	.809
	Eastern coast	43/49	88	(75-95)	31/37	84	(68-94)	.599
	N/central coast	9/11	82	(48-98)	17/19	89	(67-99)	.552
	Other countries	3/3	100	(29-100)	2/3	67	-	.273
	p-value <sup>b</sup>			.702			.205	

n/N: Number of seropositive subjects (n) among the total number of subjects (N) in each age-sex-birth region group. N, North; E, East; W, West.

<sup>a</sup>From chi-squared test for the comparison of *H. pylori* seroprevalence between sexes.

<sup>b</sup>From chi-squared test for the comparison of *H. pylori* seroprevalence among birth regions.

Supplementary Tables. *Helicobacter*. 2017;e12401.**Table S2.** Percentage of variability in the overall *H. pylori* and protein-specific seropositivity explained by Autonomous Community of birth.

	Percentage of variability explained by the Autonomous Community of birth % (95% CI)*			
	Unadjusted	Age-group adjusted	Sex adjusted	Age-group and sex adjusted
<i>H. pylori</i> +	7.9 ( 3.1 -19.1)	7.2 ( 2.7 -17.7)	7.4 ( 2.8 -18.5)	7.0 ( 2.6 -17.6)
GroEL +	0.6 ( 0.0 -17.0)	0.4 ( 0.0 -37.6)	0.0 ( 0.0 - 0.0)	0.1 (0.0 -100.0)
UreA +	0.0 **	-	-	-
HP231 +	1.1 ( 0.2 - 5.7)	1.2 ( 0.2 - 5.9)	1.1 ( 0.2 - 5.7)	1.2 ( 0.2 - 5.9)
NapA +	1.9 ( 0.4 - 8.2)	1.7 ( 0.3 - 7.8)	1.9 ( 0.4 - 8.2)	1.7 ( 0.3 - 7.8)
HP305 +	0.3 ( 0.0 - 6.3)	0.1 ( 0.0 -35.6)	0.5 ( 0.1 - 3.9)	0.4 ( 0.0 - 4.6)
HpaA +	0.0 **	-	-	-
Cagδ +	0.2 ( 0.0 - 3.5)	0.2 ( 0.0 - 3.6)	0.2 ( 0.0 - 4.0)	0.2 ( 0.0 - 3.9)
CagM +	0.0 **	-	-	-
CagA +	0.2 ( 0.0 -40.4)	0.1 ( 0.0 -97.1)	0.0 (0.0 -100.0)	0.1 ( 0.0 -99.6)
HyuA +	0.0 **	-	-	-
Catalase +	0.8 ( 0.1 - 5.2)	0.7 ( 0.1 - 5.2)	0.6 ( 0.1 - 5.4)	0.6 ( 0.1 - 5.4)
VacA +	0.0 **	-	-	-
HcpC +	0.7 ( 0.1 - 4.0)	0.7 ( 0.1 - 4.0)	0.7 ( 0.1 - 4.0)	0.7 ( 0.1 - 4.0)
Cad +	0.2 ( 0.0 - 5.4)	0.2 ( 0.0 - 5.5)	0.3 ( 0.0 - 4.7)	0.3 ( 0.0 - 4.9)
Omp +	0.1 ( 0.0 -10.6)	0.2 ( 0.0 - 5.9)	0.1 ( 0.0 -14.3)	0.1 ( 0.0 -10.0)
HomB +	0.7 ( 0.1 - 3.1)	0.6 ( 0.1 - 3.0)	0.6 ( 0.1 - 3.1)	0.6 ( 0.1 - 3.1)

\*From mixed logistic regression models adjusted for age-group and/or sex as fixed effects and with random intercepts for Autonomous Community of birth. The effect of age and sex did not varied among Autonomous Communities and consequently, the models presented in the table include these variables as fixed effects.

\*\* For these proteins, variance in their seropositivity among birth Autonomous Communities was null.

Subjects born in Autonomous Communities with very low number of participants (Balears, Canarias, Ceuta or Melilla) or in another country were not included in this analysis.